

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie
Oddělení fyziologie buňky



**Genetické interakce mutace *PRP45*
v *S. cerevisiae***

**Genetic interactions of *PRP45* mutation
in *S. cerevisiae***

Anna Valentová

2008

školitel: **RNDr. František Půta, CSc.**

Prohlašuji, že jsem předkládanou diplomovou práci vypracovala samostatně,
na základě konzultací se svým školitelem a s pomocí citovaných literárních zdrojů.

Září 2008

Anna Valentová

„Radost z uvažování a pochopení je nejkrásnějším darem přírody.“

Albert Einstein

Své upřímné poděkování bych ráda věnovala Dr. Františku Půtovi a Doc. Petru Folkovi nejen za odborné vedení této diplomové práce, ale i za mnoho cenných rad. Také bych ráda poděkovala Ondřeji Gahurovi a ostatním členům laboratoře za pomoc a podporu.

Obsah

1. Úvod	6
2. Literární úvod.....	7
2.1 Lidský faktor SKIP/NCoA-62/SNW1 a jeho orthologní proteiny	7
2.1.1 Struktura proteinů orthologních k lidskému SKIP/NCoA-62/SNW1.....	9
2.2 Protein Prp45 <i>S. cerevisiae</i>	11
2.3 Sestřih pre-mRNA <i>S. cerevisiae</i>	14
2.3.1 První a druhý transesterifikační krok sestřihu pre-mRNA.....	16
2.3.2 Průběh sestavování spliceosomu <i>S. cerevisiae</i>	17
2.3.3 Role komplexu NTC	20
2.3.4 RNA helikázy účastníci se sestřihu pre-mRNA	21
2.3.5 Druhý krok sestřihu pre-mRNA a vztahy mezi faktory	24
2.3.6 Vztah Prp45p k sestřihu pre-mRNA	28
2.3.7 Průběh spliceosomálního cyklu, recyklace sestřihových faktorů.....	30
2.4 Modelový organismus <i>S. cerevisiae</i>	33
2.4.1 Genetické interakce při studiu buněčné complexity.....	33
2.4.2 Synthetická lethality představuje významný model pro studium genetických interakcí	35
3. Materiál a metody	39
3.1 Materiál	39
3.1.1 Seznam použitých organismů	39
3.1.2 Použité vektory a plazmidy pro klonování.....	40
3.1.3 Přehled použitých vektorů a plazmidů určených k transformacím mutantních klonů.....	42
3.1.4 Přehled použitých enzymů modifikujících DNA	43
3.1.5 Použité kity pro manipulaci s nukleovými kyselinami	44
3.1.6 Seznam použitých primerů	44
3.1.7 Standardy velikostí a množství DNA fragmentů.....	45
3.1.8 Kultivační média a roztoky	46
3.2 Metody	50
3.2.1 Metody kultivace organismů	50
3.2.2 Štěpení DNA restrikčními endonukleázami.....	51
3.2.3 Amplifikace DNA pomocí PCR	51
3.2.4 Ligace DNA v roztoku	52
3.2.5 Elektroforetická analýza DNA v agarózovém gelu	53
3.2.6 Izolace fragmentů DNA z gelu pomocí NucleoSpin® Extract II.....	53
3.2.7 Zaklonování produktů PCR pomocí TOPO TA Cloning Kit	54
3.2.8 Izolace plazmidové DNA alkalickou metodou z <i>E. coli</i>	55
3.2.9 Izolace plazmidové DNA z <i>E. coli</i> pomocí NucleoSpin® Plasmid	56
3.2.10 Izolace plazmidové DNA z <i>S. cerevisiae</i> pomocí skleněných kuliček	58
3.2.11 Izolace chromozomální DNA z <i>S. cerevisiae</i>	59
3.2.12 Transformace <i>E. coli</i> elektroporací.....	61
3.2.13 Transformace <i>S. cerevisiae</i> lithium-acetátovou metodou.....	62
3.2.14 Rychlá LiAc transformace <i>S. cerevisiae</i>	64
3.2.15 Křížení a sporulace <i>S. cerevisiae</i> , tetřádová analýza.....	65
4. Výsledky	66
4.1 Příprava kmene opačného párovacího typu ke kmeni FPY4B	69
4.1.1 Křížení kmenů AVY02 a JB.....	69

4.1.2	Testování kmene AVY11 na růst v restriktivní teplotě	70
4.2	UV mutageneze a hledání klonů vykazujících synteticky lethální interakci ..	72
4.2.1	UV mutageneze	72
4.2.2	Potvrzení klonů vykazujících syntetickou lethality	74
4.3	Fenotypová charakterizace mutantních klonů	76
4.3.1	Citlivost klonů k rozdílným teplotám	76
4.3.2	Projev systému <i>ADE2/ADE3</i> u získaných klonů a ověření účinnosti transformace.....	79
4.3.3	Dominantně negativní projev mutantní alely	80
4.4	Rozdělení klonů do komplementačních skupin.....	82
4.5	Vyloučení klonů vykazujících syntetickou lethality s <i>ade3</i> nebo <i>ura3</i> ; potvrzení genetického vztahu s <i>prp45(1-169)</i>	85
4.5.1	Potvrzení syntetické lethality s mutací <i>prp45(1-169)</i>	85
4.5.2	Příprava plazmidu pAV02 (pRS315-ADE3).....	88
4.5.3	Nalezení klonů synteticky lethálních s mutací <i>ade3</i>	90
4.5.4	Příprava plazmidu pAV03 (pRS315-URA3)	90
4.5.5	Nalezení klonů vykazujících stav syntetické lethality s mutací <i>ura3</i>	94
4.6	Odhalení falešně pozitivních klonů	95
4.6.1	Příprava plazmidu pAV01 (p423ADH FUN20-ΔC5).....	95
4.6.2	Vyloučení falešně pozitivních klonů	97
4.7	Identifikace neznámých genů.....	99
4.7.1	Přímé testování vybranými geny	99
4.7.2	Transformace genomovou knihovnou	105
4.8	Identifikace mutace v genu <i>PRP22</i> u klonů AVY11 #28, #30 a #38 synteticky lethálních s <i>prp45(1-169)</i>	126
5.	Diskuze	129
5.1	Faktory druhého kroku sestřihu a role Prp45p	129
5.1.1	Prp22p uvolňuje sestřiženou mRNA ze spliceosomu	130
5.1.2	Vztah Prp22p k sestřihovým faktorům Slu7p a Prp45p.....	131
5.1.3	Protein Prp22 potlačuje sestřih aberantních substrátů	136
5.1.4	Funkční propojení proteinů Slu7, Prp18 a Prp22	137
5.2	Asociace Prp45p s komplexem NTC a jejich vzájemné propojení	141
5.2.1	Proteiny Syf1 a Syf3 tvoří kostru spliceosomu	141
5.2.2	Cef1p je esenciálním faktorem pro funkci komplexu NTC	144
5.2.3	Ntc20p se podílí na regulaci proteinu Syf1	144
5.2.4	Vztah Prp45p k faktorům komplexu NTC	145
5.3	Vztah faktorů sestřihu pre-mRNA k buněčnému cyklu.....	147
5.3.1	Genetický vztah mutace genu <i>COF1</i> s <i>prp45(1-169)</i>	148
5.3.2	Regulace aktinového cytoskeletu <i>S. cerevisiae</i>	149
6.	Závěr	151
7.	Souhrn	153
8.	Seznam literatury.....	154
9.	Příloha	165

Seznam zkratek

5-FOA	5-fluoroorotová kyselina (5-fluoroorotic acid)
aa	aminokyselinový zbytek
ADH	alkoholdehydrogenáza
bp	počet párů bazí (base pair)
BSA	hovězí sérumalbumin
(d)NTP	(deoxy)ribonukleosidtrifosfát (směs dATP, dCTP, dTTP, dGTP)
DTT	dithiothreitol
EBNA2	jaderný antigen 2 viru Epstein-Barrové
EBV	virus Epstein-Barrové
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina
G418	geneticin
GFP	fluorescenční značka (green fluorescence protein)
HA	hemaglutinin
HPV-16	lidský papillomavirus 16
kDa	kiloDalton – jednotka molekulové hmotnosti
ORF	otevřený čtecí rámec (open reading frame)
PCR	polymerázová řetězová reakce
PEG	polyetylen glykol
SDS	dodecylsulfát sodný
snRNA	malá jaderná ribonukleová kyselina
snRNP	malá jaderná ribonukleoproteinová částice
TAE	pufr Tris-acetát-EDTA
TGF-β	transforming growth factor β
UV	ultrafialové
wt	divoký typ (wild type)
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

1. Úvod

Proteiny orthologní k lidskému SKIP/NcoA-62/SNW1 jsou jaderné faktory, které byly nalezeny v souvislosti s regulací genové exprese a následnými úpravami primárních transkriptů. Lidský zástupce SKIP působí především jako transkripční faktor při dějích zahrnujících diferenciaci, karcinogenezi a další buněčnou signalizaci. Působí v rámci signálních dráh např. TGF β /Smad, E2F/pRb, Notch/CBF1 a jaderných hormonálních receptorů. Protein SKIP je také nezbytný pro sestřih pre-mRNA a v nedávné době byl identifikován jeho podíl na průběhu elongační fáze transkripce RNA polymerázy II a vzniku alternativních transkriptů některých genů HIV.

U orthologního proteinu *S. cerevisiae* FUN2O/Prp45 byla prokázána účast na sestřihu pre-mRNA, ostatní zmíněné děje nebyly doposud asociovány s funkcí tohoto faktoru. Sestřih pre-mRNA představuje komplikovaný proces vedoucí ke vzniku nativní mRNA postrádající nekódující oblasti, introny. Z hlediska podjednotkového složení spliceosomu a biochemického principu jeho funkce je tento děj velmi dobře prostudován, ale navzdory uvedeným vědomostem není pro většinu sestřihových faktorů známa jejich specifická role. Pro protein Prp45 byli identifikováni přímí interakční partneři, kteří částečně vyvozují jeho možnou úlohu zejména ve vztahu k vazbě a/nebo případné regulaci RNA helikázy Prp22p během druhého sestřihového kroku. Studium genetických interakcí pomáhá odhalit funkční zastoupení nalezených partnerů v komplexních buněčných procesech. V této diplomové práci byl zvolen genetický vztah syntetické lethality, který se již velmi dobře osvědčil v dřívějších studiích zahrnujících některé sestřihové faktory.

2. Literární úvod

2.1 Lidský faktor SKIP/NCoA-62/SNW1 a jeho orthologní proteiny

Proteiny orthologní k lidskému SKIP představují esenciální faktory s převážně jadernou lokalizací a molekulovou hmotností pohybující se nejčastěji mezi 60-80 kDa. Jednotlivé zástupce lze nalézt napříč celou eukaryotní nadříší organismů, počínaje představiteli obou významných zástupců kvasinek **Prp45p** *Saccharomyces cerevisiae* (Albers *et al.*, 2003) a **Snw1p** *Schizosaccharomyces pombe* (Ambrozková *et al.*, 2001). Dalšími proteiny jsou např. **SnwA** *Dictyostelium discoideum* (Folk *et al.*, 1996), **CeSKIP** *Caenorhabditis elegans* (Kostrouchova *et al.*, 2002), **EmSkip** *Echinococcus multilocularis* (Gelmedin *et al.*, 2005), **SmNCoA-62** *Schistosoma mansoni* (Fantappiè *et al.*, 2008), **Bx42** *Drosophila melanogaster* (Wieland *et al.*, 1992) a **SKIP/NCoA-62/SNW1** *Homo sapiens* (Dahl *et al.*, 1998; Baudino *et al.*, 1998). Jejich společným znakem je přítomnost zcela konzervovaného SNW motivu (aminokyselinové zbytky SNWKN) nacházejícího se přibližně v centrální části proteinu (Folk *et al.*, 1996).

Prvním popsaným zástupcem je Bx42 *D. melanogaster*, který po indukci hmyzím hormonem ekdysonem specificky asociuje s transkripčně aktivními oblastmi polyténních chromosomů v časných stádiích vývoje organismu (Saumweber *et al.*, 1990; Wieland *et al.*, 1992). K nejvíce studovanému zástupci patří lidský SKIP/NCoA-62/SNW1 (Dahl *et al.*, 1998; Baudino *et al.*, 1998). SKIP byl poprvé objeven v roce 1998 ve dvou na sobě nezávislých studiích. V prvním případě byl identifikován jako interakční partner ptačího retrovirového onkogenu i lidského buněčného protoonkogenu Ski (SKIP: *Ski interacting protein*; Dahl *et al.*, 1998). Ski protein představuje transkripční faktor, který se vyskytuje zejména v represorových komplexech blokujících expresi genů, jež jsou nezbytné pro průchod buněčným cyklem. V druhé studii hledali autoři selektivní interakční partnery jaderných receptorů. Podařilo se jim získat protein o molekulové hmotnosti 62 kDa, který byl

pojmenován NCoA-62, protože interaguje s ligand vazebnou doménou receptoru pro vitamín D, VDR (*nuclear receptor coactivator of 62 kDa*; Baudino *et al.*, 1998).

SKIP se účastní regulace funkce některých důležitých transkripčních faktorů (působí jako transkripční koregulátor na úrovni aktivace i represe). Kromě již představené role v rámci signalizace skrze jaderné hormonální receptory, kde SKIP interaguje např. s heterodimerním komplexem receptoru vitamínu D a retinoid X receptoru, VDR-RXR (Zhang *et al.*, 2003), působí také v rámci signálních drah TGFβ (interakční partner Smad2/Smad3 proteinů; Leong *et al.*, 2001) a Notch (váže NotchIC, transkripční faktor CBF1 a členy CBF1-korepresorového komplexu; Zhou *et al.*, 2000). K další jeho neméně významné úloze patří vazba s komplexem E2F/pRb, kde ve spolupráci s proteinem Ski zprostředkovává překonání bloku buněčného cyklu během G1 fáze vyvolané právě antionkogenem pRb nebo příbuznými pocket proteiny p130 (Prathapam *et al.*, 2002). V podobné souvislosti byla nalezena interakce proteinu SKIP s virovým transaktivátorem E7 lidského papilloma viru 16 (HPV-16), jehož cílem je opět vyvázání proteinu pRb a uvolnění transkripčního faktoru E2F (Prathapam *et al.*, 2001). Dalším z vazebných partnerů je virový transkripční koaktivátor EBNA2 (EBV), který působí v již zmiňované signální dráze Notch, kde váže transkripční faktor CBF1 (Zhou *et al.*, 2000). V neposlední řadě SKIP a PABP2 (jaderný polyA binding protein 2) tvoří ternární komplex s transkripčním faktorem MyoD specifickým pro diferenciaci svalových buněk. Oba proteiny, SKIP a PABP2, kooperativně stimulují transkripční aktivitu MyoD (Kim *et al.*, 2001). Z nejnovějších nálezů interakčních partnerů SKIP lze jmenovat např. nově objevený transkripční faktor CHES1/FOXN3 či protein Daxx (Death domain-associated protein) podílející se patrně na regulaci transkripce i apoptózy (Scott a Plon, 2005; Tang *et al.*, 2005).

Prostřednictvím proteomických analýz byl SKIP identifikován v katalytickém jádře aktivních spliceosomálních komplexů (Makarov *et al.*, 2002). Role SKIP proteinu při úpravách nascentních hnRNA molekul potvrzuje i jeho kolokalizace s SR faktorem SC-35 v tzv. speckles (Neubauer *et al.*, 1998; Mintz *et al.*, 1999). U vyšších eukaryot se sestřihové faktory nachází v jaderných speckles (IGC, interchromatin granule clusters; SC-35 domény). Jedná se o velice dynamická teritoria chudá na přítomnost DNA, jejíž proteinové a RNA-proteinové komponenty neustále cyklují mezi speckles a transkripčně aktivními oblastmi lokalizovanými do tzv. transcription

factories. Transkripce DNA a sestřih pre-mRNA jsou situovány ve fibrilárních strukturách známých jako perichromatinové fibrily (PF), které se nachází v těsné blízkosti speckles (Lamond a Spector, 2003).

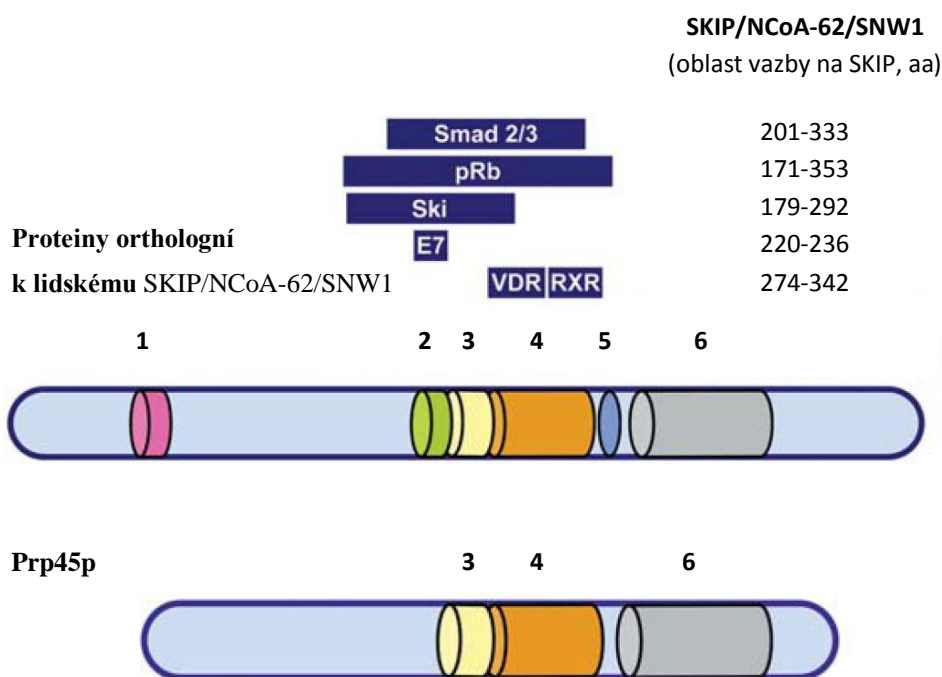
Transkripce RNA polymerázou II je proces velice úzce spjatý s regulací struktury chromatinu a dalšími ději souvisejícími s kotranskripčními a posttranskripčními modifikacemi vznikající pre-mRNA či s exportem upravených mRNA do cytosolu (Hirose *et al.*, 2000). Předpokládá se, že důležitou úlohu zde hrají i transkripční koregulátory mezi něž se řadí i SKIP/NCOA-62/SNW1 proteinu orthologní proteiny. Tyto domněnky dále potvrzuje nedávno objevená účast proteinu SKIP během elongace transkripce RNA polymerázy II (vazba k faktoru p-TEFb) a jeho podíl na vzniku alternativně sestřihovaných produktů některých genů HIV (Bres *et al.*, 2005).

2.1.1 Struktura proteinů orthologních k lidskému SKIP/NCOA-62/SNW1

V rámci uvedené skupiny proteinů lze nalézt vysokou míru homologie, 40% identita byla prokázána v rámci SNW domény (porovnáno 25 aminokyselinových zbytků v okolí 100% konzervovaného SNWKN motivu; Folk *et al.*, 1996).

Primární struktura sestává z N a C-koncové domény spojené centrální oblastí s několika vysoce konzervovanými úseky; glycin-bohatá oblast, polyprolinový motiv, SNW doména, helikální motivy a SH₂-like doména (viz. obr. 2.1.). Struktura proteinů je patrně neglobulárního charakteru. V rámci uspořádání proteinu lze nalézt několik potenciálních fosforylačních míst (včetně serinu v konzervovaném SNWKN motivu) a někteří orthologní zástupci byli identifikováni jako fosfoproteiny, SnwA (*D. discoideum*; Folk *et al.*, nepublikováno) a SKIP (*H. sapiens*; Neubauer *et al.*, 1998; Tang *et al.*, 2005). O bližším vztahu fosforylace k funkci není známo.

Pro Snw1p *S. pombe* a EmSkip *E. multilocularis* byla potvrzena schopnost homodimerizace (Ambrozková *et al.*, 2001; Gelmedin *et al.*, 2005). Podobné nálezy byly učiněny také u proteinu SnwA *D. discoideum*, jehož odhadovaná molekulová hmotnost se pohybuje kolem 79 kDa, ale skutečná nativní váha byla stanovena na 180 kDa (Ambrozková *et al.*, 2001). Je-li vztah homodimerizace u některých představitelů SNW orthologních proteinů nezbytný pro výkon funkce nebylo potvrzeno.



číselné označení	vysoce konzervované úseky centrální oblasti proteinu	SKIP/NCoA-62/SNW1 (aa pozice)	Prp45p (aa pozice)
1	glycin-bohatá oblast	56-77	-
2	polyprolinový motiv	206-234	121-152
3	SNW doména (SNWKN)	241-260 (252-256)	159-178 (170-174)
4	helikální motivy	280-336	197-253
5	druhově specifické inserty		
6	SH ₂ -like doména	378-454	274-344

Obr. 2.1. Znázornění struktury proteinu Prp45 *S. cerevisiae* a proteinů orthologních k lidskému SKIP/NCoA-62/SNW1 s vyznačenými vysoce konzervovanými úseky centrální oblasti proteinu.

V tabulce jsou doloženy aminokyselinové pozice jednotlivých konzervovaných úseků lidského SKIP a kvasinkového Prp45 proteinu. SH₂-like doména je částečně homologní s polovinou klasické SH₂ domény a polyprolinový motiv představuje potenciální vazebné místo SH3 domén. Prp45p postrádá N-koncovou část včetně glycin bohaté oblasti. Polyprolinový motiv a SH₂-like doména dosahují u této kvasinky nižší míry konzervovanosti při porovnání s ostatními orthologními zástupci. Oblasti přibližné vazby některých interakčních partnerů lidského proteinu SKIP jsou znázorněny v horní části obrázku (převzato a upraveno dle Folk *et al.*, 2004).

2.2 Protein Prp45 *S. cerevisiae*

Protein Prp45 představuje esenciální faktor o molekulové hmotnosti 42 kDa a délky 379 aminokyselinových zbytků nesoucí posttranslační modifikaci sumoylaci (Reindle *et al.*, 2006). Na základě značení pomocí GFP (green fluorescence protein) se jedná o jaderně lokalizovaný protein (Martínková *et al.*, 2002).

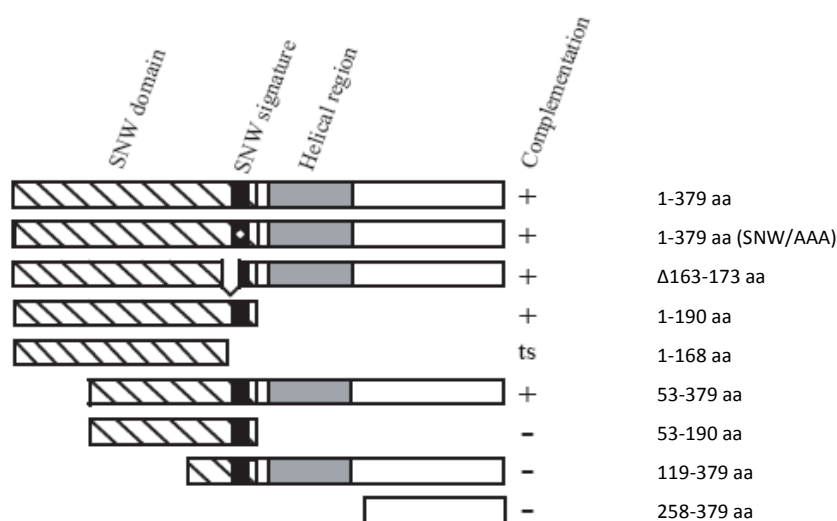
Jedinou prozatím potvrzenou rolí Prp45p *in vivo* je účast na sestřihu pre-mRNA (Albers *et al.*, 2003; Gahura *et al.*, přijato do tisku). U kvasinkového orthologa lidského SKIP proteinu nebyl blíže popsán vztah k regulaci transkripce, ačkoliv Prp45p fúzovaný s DNA vazebnou doménou je schopen aktivovat transkripci reporterového genu *in vivo* (Martínková *et al.*, 2002). Pro SKIP byla kromě koregulační funkce specifických transkripčních faktorů prokázána i aktivace exprese reporterového genu z bazálních promotorů virového původu *in vivo*. Přítomnost více kopií GC boxu v promotorové oblasti byla v pozitivním souladu s vyšší transkripční účinností. Předpokládá se, že efektivní formování bazálního transkripčního komplexu podporuje i následné účinnější vyvazování SKIP (Nagai *et al.*, 2004).

Při porovnání struktury proteinu Prp45 *S. cerevisiae* s jeho orthologními partnery je výrazně N-koncově kratší. Absence vysoce konzervované glycin-bohaté oblasti, přítomnost částečně homologního polyprolinového motivu (počet prolinů je redukován ze sedmi na pouhé dva) a nízká podobnost SH₂-like domény může poukazovat na „jednodušší“ buněčnou úlohu v porovnání s ostatními představiteli vyšších eukaryot (viz. obr. 2.1, kap. 2.1.1.). Nezastupitelnost proteinu Prp45 jeho orthologními zástupci SnwA *D. discoideum*, Snw1p *S. pombe* a SKIP *H. sapiens* podporuje názor na jeho úzce specifickou roli (Folk *et al.*, 2004). Práce pocházející ze stejného roku však připouští substituci kvasinkového proteinu lidským SKIP (Figueroa a Hayman, 2004).

Gen *PRP45/FUN20* byl identifikován na počátku 90. let 20. století skupinou profesora Pringla z Michiganské univerzity zabývající se studiem genového uspořádání na chromosomu I *S. cerevisiae*. Gen *PRP45/FUN20* stanovili jako esenciální, ale prostřednictvím náhodné mutagenese se jim nepodařilo nalézt žádnou mutantní variantu vyvolávající citlivost ke zvýšené teplotě 37°C, která by jim umožnila další studie (Fun Uknown; Diehl a Pringle, 1991; Harris *et al.*, 1991).

V naší laboratoři byly vytvořeny N i C-koncové deleční varianty *PRP45* (nesené na plazmidech), které byly posléze testovány na schopnost komplementace po sporulaci a tetradové analýze diploidního kmene s genetickým pozadím *PRP45/prp45Δ*. Přehled nejvýznamnějších mutantních zkrácenin zobrazuje obr. 2.2. Rozsáhlé delece proteinu Prp45 bez zásadního vlivu na viabilitu buněk jsou v souladu s neúspěšnými pokusy z roku 1991.

Esenciální část Prp45p pokrývá délku 168 N-koncových aminokyselinových zbytků a zbývající úsek (211 aa) je postradatelný *in vivo* (Gahura *et al.*, přijato do tisku). Oblast 1.-52. aminokyselinového zbytku je slabě konzervovaná (mutanta s 53.-379. aa je schopná komplementace divoké alely), následující úsek (53.-123. aa) je ze 42% podobný SKIP proteinu *H. sapiens*. Mutanta obsahující 53.-190. aminokyselinový zbytek není životaschopná, protože nepřítomnost obou koncových úseků současně pravděpodobně zabraňuje vzniku nativní struktury proteinu (Martínková *et al.*, 2002).

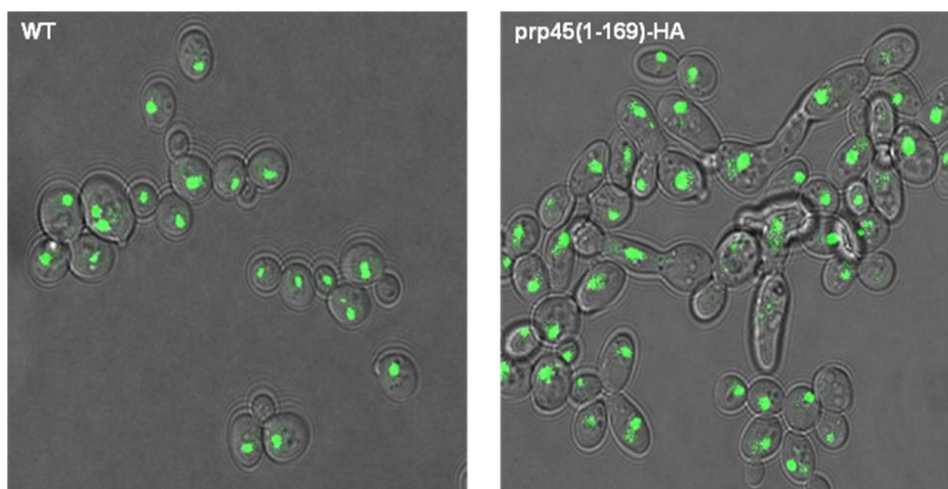


Obr. 2.2. Přehled nejdůležitějších N a C-koncových delečních variant proteinu Prp45 (převzato a upraveno dle Gahura *et al.*, přijato do tisku).

Mutantní verze s označením SNW/AAA (pozice 170.-172. aa) představuje aminokyselinovou záměnu části zcela konzervovaného SNW motivu (aminokyselinové zbytky SNWKN). Označení Δ163-173 aa zobrazuje protein s delecí deseti aminokyselinových zbytků uvnitř SNW domény (159.-178. aa, na pozici 170.-174. aa se nachází SNW motiv). Pozitivní znaménko + zobrazuje varianty Prp45p schopné komplementovat divokou alelu.

Konzervovaný SNW motiv je pro funkci Prp45p *S. cerevisiae* zcela postradatelný, ale jeho nepřítomnost v kombinaci s delecí C-konce (mutanta 1.-168. aa) zapříčiňuje citlivost buněk ke zvýšené teplotě 37°C. Pouhá delece SNW motivu (mutanta Δ 163.-173. aa) či jeho substituce (mutace 170SNW/AAA) růst buněk v uvedené teplotě neovlivňuje (Martínková *et al.*, 2002; Gahura *et al.*, přijato do tisku).

K plazmidové variantně mutanty 1-168 aa byla připravena homologní rekombinací genomová verze *prp45(1-169)*, která se zdála být nejvhodnější z hlediska rozsáhlejší charakterizace proteinu. Kromě již zmíněné citlivosti k restriktivní teplotě 37°C lze u mutanty *prp45(1-169)* nalézt i některé další významné fenotypové projevy. Kultivace buněk za běžné teploty 30°C je provázena drobným defektem buněčného dělení srovnatelným s některými *cdc* mutanty (*cell division cycle* mutants; Hartwell, 1974) a vyšší citlivostí k mikrotubulárním inhibitorům, např. nocodazolu (Gahura *et al.*, přijato do tisku). Porovnání rychlosti růstu buněk s mutací *prp45(1-169)* a divokou alelou *PRP45* při 30°C neodhalilo zásadní rozdíly.



Obr. 2.3. Exprese *prp45(1-169)* při teplotě 30°C vede ke vzniku aberantního buněčného tvaru podobného buňkám s mutacemi v genech souvisejících s buněčným cyklem.

Vlevo jsou zobrazeny buňky s divokou alelou *PRP45*, vpravo je mutace *prp45(1-169)*. Fluorescenční vizualizace jádra při užití proteinu Cbf5 značeného GFP (převzato a upraveno dle Gahura *et al.*, přijato do tisku).

2.3 Sestřih pre-mRNA *S. cerevisiae*

Transkripcí eukaryotní RNA polymerázou II vzniká primární transkript (heterogeneous nuclear RNA, hnRNA), který dále podstupuje několik úprav vedoucích ke vzniku funkční mRNA. Jednotlivé kotranskripční a posttranskripční modifikace (pre-mRNA processing) probíhají v jádře a sestávají z přidání 7-methylguanosenové čepičky k 5'konci (RNA capping), úpravy 3'konce a jeho polyadenylaci (RNA 3'end formation and polyadenylation), odstranění intronů sestřihem pre-mRNA (RNA splicing) a v některých případech i editací RNA (RNA editing).

V roce 1967 se profesor Hartwell a jeho spolupracovníci zabývali projektem zaměřeným na hledání mutací *S. cerevisiae*, které způsobují citlivost buněk ke zvýšené teplotě 36°C (Hartwell, 1967). Ve své práci našli různé mutantní buňky akumulující RNA při kultivaci v restriktivní teplotě, tzv. *rna mutanty*, které následně rozdělili do deseti komplementačních skupin. Později se podařilo u některých mutantů identifikovat účast na procesu úprav pre-mRNA a byly přejmenovány na PRP geny (pre-mRNA processing, Vijayraghavan *et al.*, 1989).

Základním cílem sestřihu pre-mRNA je vystřížení intronů z primárního transkriptu a následné spojení exonů za vzniku funkční mRNA. Introny jsou obsaženy přibližně u 250 genů, které představují méně než 7% všech transkripčních oblastí *S. cerevisiae* (Spingola *et al.*, 1999). U člověka se očekává výskyt nekódujících oblastí až u 95% genů (Lander *et al.*, 2001). Kvasinkové geny obsahují obvykle pouze jediný intron (max. nalezená délka 1 002 bp), lidské geny jsou v průměru přerušeny až 8 introny dosahujícími velikosti i přes 10 000 nukleotidů (Lander *et al.*, 2001 a Pleiss *et al.*, 2007).

V *S. cerevisiae* nebyl zcela potvrzen kotranskripční průběh sestřihu a existuje-li propojení transkripce se sestřihem, není objasněno. U vyšších eukaryot je znalost poněkud detailnější. Doména, která se nachází na C-konci (CTD: C-terminal domain) RNA polymerázy II, sestává z 52 opakování sedmi konzervovaných aminokyselinových zbytků YSPTSPS (*S. cerevisiae* pouze 26 opakování). C-koncová doména je odpovědná za správný průběh transkripce (vyvazování faktorů pro elongační i terminační fázi) a úprav vznikající pre-mRNA (Proudfoot *et al.*, 2002). Oba přítomné seriny, serin 2 (fosforylace ovlivňuje vazbu faktorů pro úpravy 3'konce pre-mRNA) a serin 5 (po fosforylaci následuje vazba komplexů podílejících se na přidání 7-methylguanosenové čepičky k 5'konci) jsou v závislosti na určité fázi

transkripce rozdílně fosforylovány. Vazba komplexu faktorů nezbytných pro sestřih pre-mRNA nastává po defosforylaci serinu 5 CTD RNA polymerázy II a sestřih probíhá u vyšších eukaryot kotranskripčně (Kornblihtt *et al.*, 2004). Některé nejnovější práce kotranskripční průběh sestřihu u kvasinek nevylučují (např. Kotovic *et al.*, 2003; Görnemann *et al.*, 2005, Lacadie *et al.*, 2006 a Tardiff *et al.*, 2006). Hlavní úlohu při rozhodování o kotranskripčním či posttranskripčním průběhu sestřihu hraje pravděpodobně velikost exonu 2. Dosahuje-li délky více než 1 000 bp, sestřih pre-mRNA probíhá kotranskripčně. Transkripce genů s kratší velikostí exonu 2 (pod 1 000 bp) je ukončena dříve, než stihne dojít k řádnému složení spliceosomu, sestřih je tedy posttranskripčního charakteru (Lacadie *et al.*, 2006 a Tardiff *et al.*, 2006). Většina genů *S. cerevisiae*, které obsahují intron s délkou exonu 2 kratší 1 000 bp, je zastoupena ribosomálními geny. Průměrná délka exonů 2 se pohybuje v rozmezí 300-400 nukleotidů. Celkově se kotranskripční průběh předpokládá u pouhých 5-10% genů *S. cerevisiae* (Tardiff *et al.*, 2006).

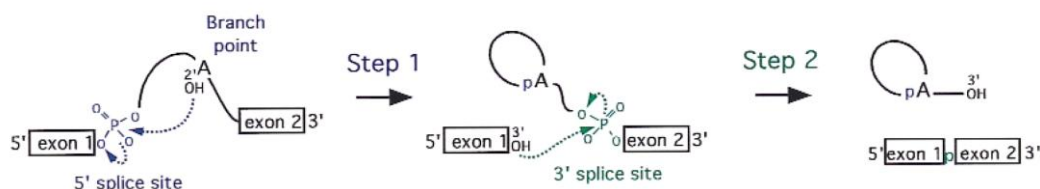
V nascentní pre-mRNA jsou intronové oblasti specifikovány pomocí tří krátkých konzervovaných sekvencí nacházejících se v okolí 5' a 3' konců intronu. V *S. cerevisiae* jsou sekvence určeny takto: 5'sestřihové místo R/GUAUGU, oblast větvení s adenosinem (branchpoint) UACUAAC a 3'sestřihové místo PyAG/R (Spingola *et al.*, 1999). Konzervované sekvence jsou rozpoznány během sestavení spliceosomu, který představuje vysoce dynamický ribonukleoproteinový komplex skládající se z pěti U snRNP (small nuclear ribonucleoprotein particles; U1, U2, U4/U6 a U5) a nejméně z dalších 80 non snRNP proteinů (shrnuto v Nilsen, 2003; Jurica a Moore, 2003). U snRNP partikule jsou složeny z šesti až deseti proteinů, které obsahují různé vazebné motivy, a U snRNA, jež patří do podrodiny malých jaderných RNA bohatých na uracil. Hlavní funkcí ribonukleoproteinových partikul je přiblížení obou konců intronu při sestřihu pre-mRNA.

U vyšších eukaryot SR faktory (serine- and arginine-rich proteins) a hnRNP proteiny (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins particles, převážně negativní faktory ve vztahu k sestřihu) ovlivňují sestřih pre-mRNA, usnadňují nalezení správných sestřihových míst a podílí se na regulaci alternativního sestřihu (shrnuto v Sanford *et al.*, 2005). Vazebná místa pro tyto faktory jsou přítomna jak v intronové tak také v exonové části, ale pouze SR proteiny vázané k ESE's (exonic splicing enhancers) mají pozitivní charakter na výběr sestřihových míst a stabilizaci vazby

sestřihových faktorů. *S. cerevisiae* postrádá funkční ekvivalenty většiny SR a hnRNP proteinů a nebyl zcela potvrzen ani alternativní průběh sestřihu u některých pre-mRNA. Drobný náznak regulace alternativního průběhu sestřihu byl pozorován u genů kódujících meiotické faktory, které jsou trvale transkribovány, ale pouze při procesu meiózy podstupují řádný sestřih umožňující vznik funkční mRNA (Davis *et al.*, 2000; Juneau *et al.*, 2007).

2.3.1 První a druhý transesterifikační krok sestřihu pre-mRNA

Jaderný sestřih pre-mRNA probíhá dvěma následnými transesterifikačními reakcemi. Transesterifikace je proces, při kterém je jedna fosfodiesterová vazba vyměněna za jinou, to znamená, že celkový počet vazeb zůstává zachován. Energie uvolněná při rozštěpení vazby mezi nukleotidy je využita k tvorbě jiné vazby a pro samotnou transesterifikaci není vyžadováno dodání energie z vnějšku. V prvním katalytickém kroku 2'volná hydroxylová skupina posledního adenosinu (branchpoint) v konzervované oblasti větvení (UACUAAC) nukleofilně napadá fosfodiesterovou vazbu v 5'sestřihovém místě. Dochází k tvorbě lasovité struktury spojené s 3'koncem exonu 2. V druhém katalytickém kroku 3'hydroxylová skupina 5'koncového exonu 1 opět nukleofilně napadne fosfodiesterovou vazbu tentokrát v 3'sestřihovém místě a dojde ke spojení exonu 1 a 2 (viz. obr. 2.4). Uvolněná lasovitá struktura je pomocí Dbr1 (debranching) enzymu linearizována hydrolýzou 5'-2' fosfodiesterové vazby v oblasti větvení (branchpoint) a lineární intron je odstraněn pomocí specifických RNáz (Chapman a Boeke, 1991).

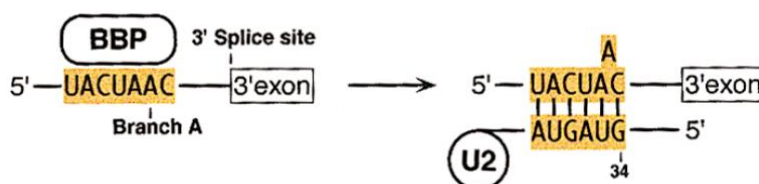


Obr. 2.4. Sestřih pre-mRNA sestává ze dvou transesterifikačních reakcí katalyzovaných ribonukleoproteinovým spliceosomálním komplexem (Collins a Guthrie, 2000).

2.3.2 Průběh sestavování spliceosomu *S. cerevisiae*

Skládání spliceosomu u kvasinek začíná vazbou U1 snRNP k 5'sestřihovému místu. Specifita vazby je zajištěna párováním mezi sekvencí intronu v okolí 5'sestřihového místa (**GUAUGU**) a 5'koncem U1 snRNA (shrnutí v Newman, 2008). Sekvence mezi oblastí větvení a 3'sestřihovým místem je rozeznána vazbou BBP (branchpoint binding protein) a Mud2p (Abovich *et al.*, 1994). Protein Mud2 představuje kvasinkového orthologa savčího sestřihového faktoru U2AF⁶⁵, který se váže u vyšších eukaryot k polypyrimidinovému úseku, jenž se nachází před 3'sestřihovým místem a je nezbytný pro sestřih pre-mRNA (Berglund *et al.*, 1998). Faktor U2AF⁶⁵ (U2 snRNP auxiliary factor of 65 kDa) je v heterodimerním spojení s U2AF³⁵ (U2 snRNP auxiliary factor of 35 kDa) a působí při zprostředkování prvotního kontaktu U2 snRNP s oblastí větvení a při nalezení správného 3'sestřihového místa (Wu *et al.*, 1999). V *S. cerevisiae* nebyl nalezen ortholog lidského faktoru U2AF³⁵ a tvorba heterodimeru byla analyzována mezi proteiny Mud2 (ortholog U2AF⁶⁵) a BBP (Wang *et al.*, 2008).

Vstup další partikule, U2 snRNP, do spliceosomálního komplexu vytěsňuje proteiny BBP a Mud2p z vazby s oblastí větvení. Místo větvení zastoupené adenosinem (branchpoint) je z interakce s U2 snRNP vynecháno, protože později působí při nukleofilním napadení 5'sestřihového místa (Query *et al.*, 1994). U1 snRNP interaguje v počáteční fázi sestavování spliceosomu s proteinem BBP, následný rozpad komplexu Mud2-BBP-pre-mRNA tuto vazbu přeruší a U1 snRNP je poté vázána slaběji (Rutz a Seraphin, 1999).

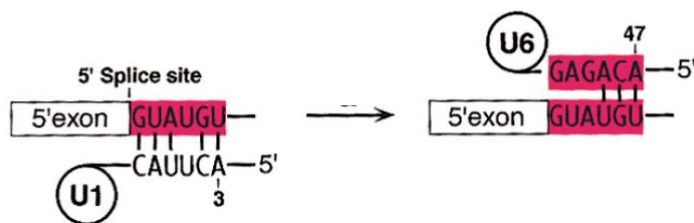


Obr. 2.5. Nahrazení vazby proteinu BBP k oblasti větvení malou jadernou U2 snRNA.

U2 snRNA při interakci s konzervovaným úsekem oblasti větvení vynechá z interakce branchpoint (převzato a upraveno dle Staley a Guthrie, 1998).

Poté se váže U4/U6.U5 tri-snRNP komplex a dochází k rozsáhlým konformačním změnám. Uvolní se U1 a U4 snRNP, která doposud udržovala U6 snRNP v neaktivním stavu. U4 a U6 snRNA jsou vzájemně vázány dvěma intermolekulárními helixy (Madhani a Guthrie, 1992). Následuje párování U2 s U6 snRNP a uvedení U6 snRNA do aktivního stavu charakterizovaného vznikem důležité vnitřní vlásenky se smyčkou (ISL, internal stem-loop), která se na základě nejnovějších nálezů podílí na uvolnění U1 snRNP ze spliceosomu (McManus *et al.*, 2007). ISL struktura vykazuje strukturní podobnost s doménou 5 autokatalytických intronů skupiny II a obsahuje dynamickou nepárující oblast (ISL bulge region) zodpovědnou za vazbu hořčnatých kationtů Mg^{++} (nukleotid U80) potřebných pro obě transesterifikační reakce. U6 snRNP podjednotka tvoří zřejmě katalytické centrum spliceosomu (shrnutí v Staley a Guthrie, 1998; Newman, 2008).

První tři nukleotidy **ACAGAG** sekvence U6 snRNA párují s 5'sestřihovým místem, **GUAUGU**, tato interakce je nezbytná pro první katalytický krok (shrnutí v Newman, 2008). U2 a U6 helixy, které vznikly při interakci obou partikulí, pravděpodobně řídí správné cílení nukleofilního ataku adenosinu (branchpoint) k 5'sestřihovému místu.



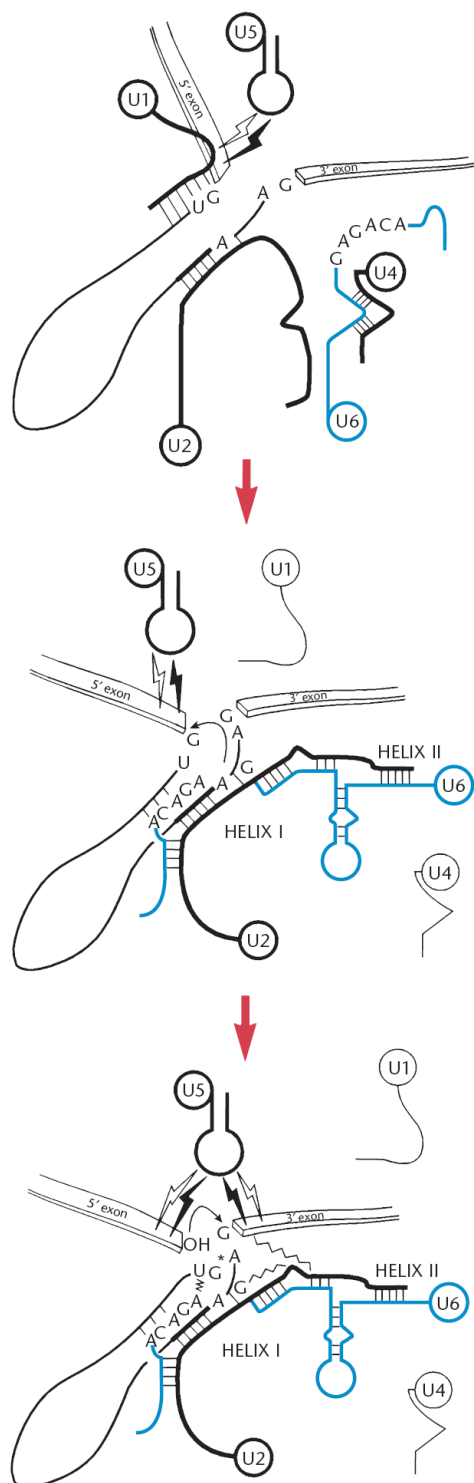
Obr. 2.6. Znárodnění specifického párování bazí konzervovaných oblastí mezi 5'sestřihovým místem a malými jadernými ribonukleoproteinovými partikulemi U1 a posléze U6 (převzato a upraveno dle Staley a Guthrie, 1998).

U5 snRNA obsahuje konzervovanou oblast (GCCUUUUAC) nacházející se v 11 nukleotidů dlouhé katalytické smyčce 1, která se váže k exonům 1 a 2 v bezprostředním okolí 5'a 3' sestřihového místa (shrnutí v Newman, 2008). Interakce U5 snRNP s 5'sestřihovým místem je dána před první transesterifikační reakcí a zůstává zachována po oba kroky. Vazba smyčky 1 U5 snRNA s oblastí exonu 2 nastává teprve po proběhnutí prvního kroku a je zodpovědná za přiblížení exonu 1 a 2 pro druhý katalytický krok. Exonové oblasti jsou velmi málo

konzervované a specifitu vazby s U5 snRNA zajišťuje protein Prp8 asociovaný s U5 snRNP (Teigelkamp *et al.*, 1995a).

Kromě výše popsaného způsobu sestavování spliceosomu, který vychází zejména z *in vitro* analýz, byl v nedávné době u *S. cerevisiae* izolován tzv. penta-snRNP

komplex, který obsahuje všechny snRNP a přibližně 85% známých sestřihových faktorů. Nově nalezený komplex se váže k cílové pre-mRNA již jako celek a teprve po jeho vazbě dochází k strukturním přestavbám v rámci předpřipraveného komplexu, které dají vznik aktivované formě spliceosomu. Studie *in vitro* v přítomnosti izolované penta-snRNP partikule potvrzují schopnost sestřihu pre-mRNA (Stevens *et al.*, 2002).



Obr. 2.7. Průběh dvou transesterifikačních reakcí při sestřihu pre-mRNA
(převzato dle Newman, 2008).

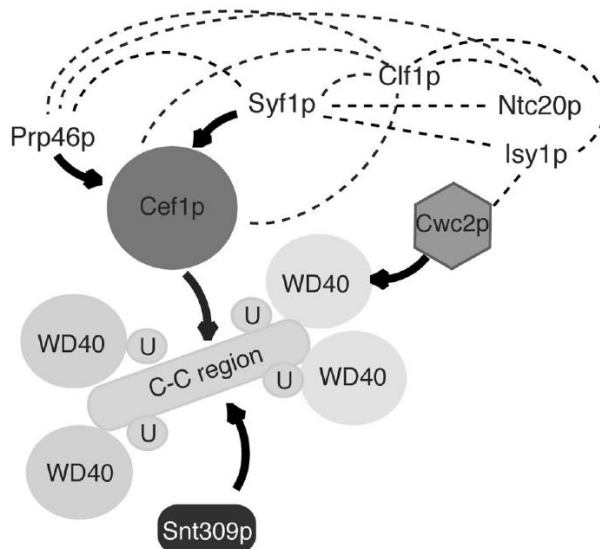
2.3.3 Role komplexu NTC

Po uvolnění U1 a U4 snRNP se váže k spliceosomu proteinový komplex NTC (the Prp19-associated complex, nineteen complex), který se podílí na specifické interakci U5 a U6 snRNP s cílovou oblastí pre-mRNA a zajišťuje aktivaci spliceosomu (Chan *et al.*, 2003; Chan a Cheng, 2005). Komplex NTC je asociován se spliceosomem po oba kroky sestřihu pre-mRNA a zůstává vázán v postsestřihovém uspořádání, které je rozvolněno na jednotlivé proteiny a ribonukleoproteinové partikule. 3'koncová oblast U6 snRNP, která váže intronovou sekvenci v blízkosti 5'sestřihového místa, je vázána s Lsm komplexem (Lsm2-Lsm8). Komplex NTC pravděpodobně zprostředkovává strukturní změny týkající se U6 snRNP, které posléze vedou k uvolnění Lsm proteinového heptameru a vazbě U6 snRNP k intronu (Chan *et al.*, 2003).

Komplex NTC byl prvně popsán v roce 1994 a nazván podle kvasinkového sestřihového faktoru Prp19p. Sestává minimálně z deseti proteinů např. Prp19p, Syf1p (Ntc90), Cef1p (Ntc85), Syf3p (Clf1, Ntc77), Prp46p (Ntc50), Cwc2p (Ntc40), Syf2p (Ntc31), Isy1p (Ntc30), Snt309p (Ntc25) a Ntc20p (Tarn *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1998; Tsai *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2001 a 2002). Všichni zástupci byli nalezeni v asociaci s penta-snRNP komplexem (Stevens *et al.*, 2002). Proteomické analýzy odhalily podobné komplexy i u jiných organismů, např. kvasinky *S. pombe* nebo některých vyšších eukaryot (McDonald *et al.*, 1999; Ohi *et al.*, 2002).

Centrální komponentu, která udržuje stabilitu a strukturu komplexu NTC, představuje protein Prp19, jenž vytváří esenciální tetramerní uspořádání *in vitro* i *in vivo* potřebné pro funkci *in vivo* (Tarn *et al.*, 1994; Ohi *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2003). Prp19p slouží jako „lešení“ pro vazbu ostatních proteinů komplexu NTC a jejich vzájemné uspořádání a přímo interaguje se třemi faktory, Cef1p, Snt309p a Cwc2p (Chen *et al.*, 1998; Tsai *et al.*, 1999; Ohi a Gould, 2002; Chen *et al.*, 2002). Prp19p obsahuje tři specifické motivy, N-koncový U-box, centrální predikovanou coiled-coil strukturu a C-koncovou globulární část s WD40 repeticemi (Ohi a Gould, 2002). U-box je do jisté míry homologní s RING doménou charakteristickou pro E3 ubiquitin ligázu. Předpokládá se, že tato doména je odpovědná za modifikace jednotlivých substrátů, které vyvolávají změny v organizaci a funkci komplexu NTC. Pro Prp19p byla prokázána ubiquitin ligázová aktivita *in vitro* (Ohi *et al.*, 2003). Interakční partneři Cef1p a Snt309p se váží k U-boxu a faktor Cwc2p je vázán

k WD40 repetitím. Protein Snt309 pomáhá stabilizovat tetramerní konformaci Prp19p a vytváří vazebné místo pro Cef1p, ale přímá interakce mezi Snt309p a Cef1p nebyla potvrzena (Ohi a Gould, 2002; Ohi *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 1998).



Obr. 2.8. Centrální protein Prp19 komplexu NTC vytváří tetramerní konformaci.

Proteiny Cef1, Snt309 a Cwc2 jsou přímými interakčními partnery Prp19p. Většina ostatních proteinů je vázána prostřednictvím proteinu Cef1 k centrálnímu faktoru (Ohi *et al.*, 2005).

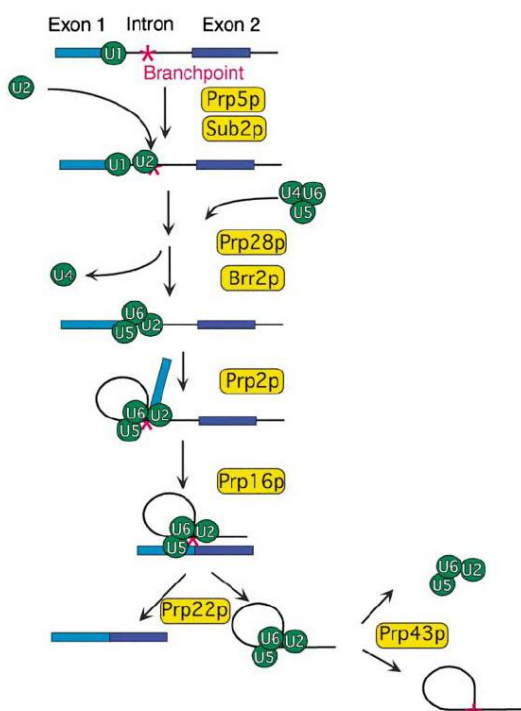
2.3.4 RNA helikázy účastnící se sestřihu pre-mRNA

Srovnáním sestřihových snRNA z různých vzdáleně příbuzných eukaryotních organismů lze nalézt konzervovanost určitých úseků primární sekvence a sekundární struktury. Motivy nacházející se u jednotlivých snRNA jsou důležité pro správné párování nukleotidů v oblastech kontaktu s konzervovanými úseky pre-mRNA. Velmi významnou úlohu zde hrají vazby intramolekulárního (v rámci jedné snRNA) a intermolekulárního (mezi snRNA nebo snRNA a pre-mRNA) charakteru. Během sestřihu jsou dynamické přestavby uvnitř spliceosomu důležité pro správné rozpoznání intronu a pro vytvoření funkčního katalytického jádra (Staley a Guthrie, 1998). Proteiny DExD/H box rodiny hrají důležitou roli v řízení přestaveb pomocí rozvolnění jednotlivých RNA duplexů vytvořených během sestřihu. Samotný sestřih nevyžaduje dodání energii, protože probíhá transesterifikační reakcí. Energie získaná hydrolýzou ATP je však vyžadována k přestavbám interakcí mezi RNA

molekulami eventuálně RNA-proteiny v rámci spliceosomu, a proto se tyto proteiny označují jako RNA-závislé ATPázy/RNA helikázy.

DExD/H box proteiny patří do druhé superrodiny helikáz (superfamily 2, SF2) a sdílí vysoce konzervovanou helikázovou doménu, která obsahuje motiv DExD/H (označení aminokyselinových zbytků), na jehož základě se dělí do jednotlivých rodin DEAD, DEAH a DEx¹H (Gorbalenya a Koonin, 1993; Staley a Guthrie, 1998; de la Cruz *et al.*, 1999). Helikázová doména u DExD/H box proteinů nese nejčastěji sedm až devět konzervovaných motivů, které jsou nezbytné pro vazbu a hydrolýzu ATP, interakci se substrátem (molekula RNA nebo protein) a pro vlastní helikázovou aktivitu.

U *S. cerevisiae* bylo nalezeno celkem osm esenciálních proteinů z DExD/H box rodiny (viz. obr. 2.9), které se účastní sestřihu pre-mRNA: Brr2p (DExH, znám také pod názvy Snu246, Rss1, Prp44 a Slt22), Prp2p (DEAH), Prp5p (DEAD), Prp16p (DEAH), Prp22p (DEAH), Prp28p (DEAD), Prp43p (DEAH) a Sub2p (DEAD) (Silverman *et al.*, 2003). Hydrolýza ATP je vyžadována pro sestavení spliceosomu, pro oba katalytické kroky, uvolnění sestřižené mRNA a následný rozpad zbylého spliceosomálního komplexu.



Obr. 2.9. Průběh sestřihu pre-mRNA a přehled osmi RNA helikáz DExD/H box proteinů účastnících se jednotlivých fází strukturálních změn spliceosomu (převzato a upraveno dle de la Cruz, *et al.*, 1999).

¹ x označuje jakýkoliv aminokyselinový zbytek

Protein Prp5 je první RNA helikázou, která se účastní sestavování spliceosomálního komplexu. Podílí se na primárním rozpoznání intronu a nepřímo stabilizuje vazbu malé jaderné ribonukleoproteinové partikule U2 k pre-mRNA (Dayyeh *et al.*, 2002). Prp5p katalyzuje uvolnění faktoru Cus2p, který zprostředkoval vnitřní přestavby U2 snRNA vedoucí ke vzniku aktivované partikule schopné se vázat k pre-mRNA (Perriman *et al.*, 2003; Xu a Query, 2007). RNA helikáza Sub2p je vyžadována při procesu vazby U2 snRNP do spliceosomu a jejím cílem je pravděpodobně komplex Mud2-BBP-pre-mRNA a jeho destabilizace (Kistler a Guthrie, 2001; Zhang a Green, 2001; Wang *et al.*, 2008). Protein Prp28 se uplatňuje opět v časně fázi sestavování spliceosomu, neboť rozvolňuje vazbu mezi U1 snRNP a 5'sestřihovým místem (Staley a Guthrie, 1999). RNA helikáza Brr2p asociovaná s U5 snRNP vykazuje duální funkci, katalyzuje rozvinutí vazby mezi U4 a U6 snRNP, ale podílí se rovněž na rozvolnění interakcí mezi U2/U6.U5 tri-snRNP a intronem v postsestřihovém komplexu (Raghunathan a Guthrie, 1998; Kim a Rossi, 1999; Small *et al.*, 2006). Obě zmíněné helikázy, Prp28 a Brr2, jsou regulovány proteinem Prp8, který zabráňuje jejich předčasné aktivaci (Kuhn *et al.*, 2002). Před první transesterifikační reakcí Prp2p katalyzuje sérii strukturních změn, které vyústí v aktivaci spliceosomu (Kim a Lin, 1996). Za vazbu Prp2p do spliceosomu je zodpovědný faktor Spp2p (Silverman *et al.*, 2004; Roy *et al.*, 1995). Helikáza Prp16p působí před druhým katalytickým krokem a kontroluje správně zvolený branchpoint (Burgess a Guthrie, 1993). Na základě interakčních studií se předpokládá vazba Prp16p k spliceosomu prostřednictvím dříve vázané helikázy Brr2p (van Nues a Beggs, 2001). Předposlední helikáza Prp22p zabráňuje ligaci exonů při nesprávně zvoleném 3'sestřihovém místě a uvolňuje sestřiženou mRNA ze spliceosomu (Schwer a Gross, 1998; Wagner *et al.*, 1998; Mayas *et al.*, 2006). Jestliže je průběh druhé transesterifikační reakce pomalý vlivem např. ne zcela správného zaujetí nativní struktury vyžadované pro druhý krok, Prp22p umožní v rámci sestřihového komplexu částečného rozvolnění a nalezení potřebné konformace nezbytné pro náležitý průběh. Pokud však spliceosomální komplex nedokáže podstoupit potřebnou vnitřní přestavbu, je sestřih blokován a posléze částečně sestřižená pre-mRNA degradována (Mayas *et al.*, 2006). Poslední důležitou RNA helikázou DExD/H box proteinů je Prp43p, který se podílí na rozvolnění spliceosomu a uvolnění lariátové struktury (Arenas a Abelson, 1997; Martin *et al.*, 2002; Tsai

et al., 2005). Za interakci Prp43p s postsestřihovým komplexem je odpovědná dvojice proteinů Ntr1 a Ntr2, které tvoří stabilní heterodimer a Ntr1p váže a zároveň i stimuluje helikázu Prp43p (heterotrimer nese označení NTR komplex). Druhý z interakčních partnerů, Ntr2p, spojuje NTR komplex s U5 snRNP prostřednictvím helikázy Brr2p (Tsai *et al.*, 2005 a 2007; Tanaka *et al.*, 2007).

2.3.5 Druhý krok sestřihu pre-mRNA a vztahy mezi faktory

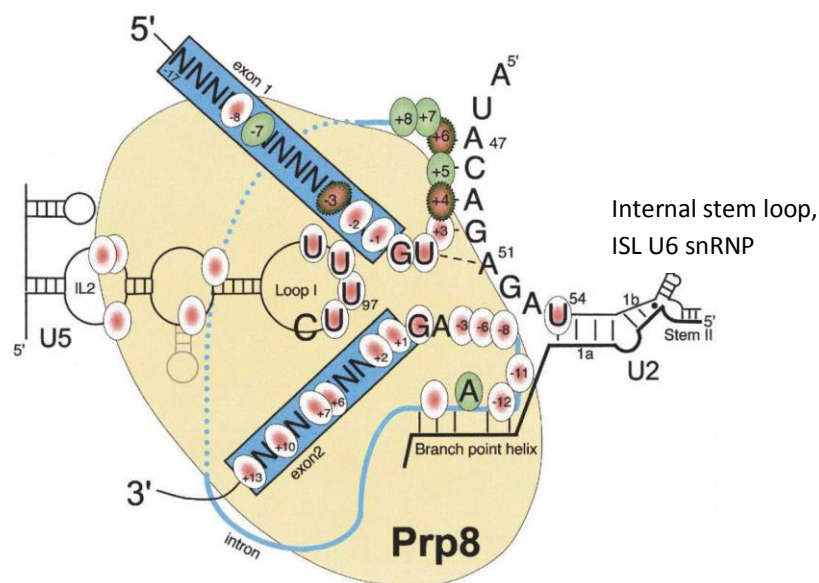
Jak již bylo uvedeno dříve, po prvním sestřihovém kroku vzniká meziprodukt lasovité struktury, který je tvořen smyčkou mezi 5'koncem intronu a branchpoint a na 3'konci je vázán exon 2. V druhé transesterifikační reakci 3'volná hydroxylová skupina exonu 1 nukleofilně napadá fosfodiesterovou vazbu v 3'sestřihovém místě a následuje spojení obou exonů, 1 a 2, a uvolnění lasovité formy intronu.

Na druhém kroku sestřihu pre-mRNA *S. cerevisiae* se podílí i řada důležitých proteinů např. Prp8p, Prp16p, Prp17p, Slu7p, Prp18p a Prp22p, a esenciálními jsou Slu7p, Prp8p, Prp16p a Prp22p (Schwer a Gross, 1998; Umen a Guthrie, 1995a). Pro čtyři faktory, Prp8p, Prp16p, Prp22p a Slu7p, byla prokázána interakce s 3'sestřihovým místem nebo v jeho těsné blízkosti (McPheeters *et al.*, 2000; Teigelkamp *et al.*, 1995a a 1995b; Umen a Guthrie, 1995b). Přímý výběr 3'sestřihového místa (PyAG, Py: pyrimidinová báze) není určen na základě párování s žádnou snRNA. Zdá se, že zde hraje značnou roli předchozí rozpoznání sekvence nacházející se v okolí branchpoint. Jako 3'sestřihové místo je u *S. cerevisiae* určen první dinukleotid AG s optimální vzdáleností 18 až 22 nukleotidů od konzervované oblasti s branchpoint (Chen *et al.*, 2000). Skutečná vzdálenost se však pohybuje v rozmezí 9 až 143 nukleotidů (Spingola *et al.*, 1999). První a poslední nukleotid intronu se vzájemně kontaktují (obvykle G-G) a jejich vazba je nekanonického charakteru párování bazí, non-Watson-Crick (Chanfreau *et al.*, 1994).

Konečné rozpoznání 3'sestřihového místa pro druhý krok je určeno U5 snRNA, Prp8p, Slu7p a dalšími proteiny (Umen a Guthrie, 1995b; Crotti *et al.*, 2007). Faktor Prp8p stabilizuje ve spolupráci s Prp18p v druhém kroku slabou sekvencně nespecifickou interakci mezi konzervovanou smyčkou 1 U5 snRNA a sekvencí následného exonu 2 (Teigelkamp *et al.*, 1995a; Bačíková a Horowitz, 2005; Aronová *et al.*, 2007). Také se předpokládá, že Prp8p pomáhá upevnit terciální strukturu U6 snRNA při vazbě s 5' a 3'sestřihovým místem (Collins a Guthrie, 1999).

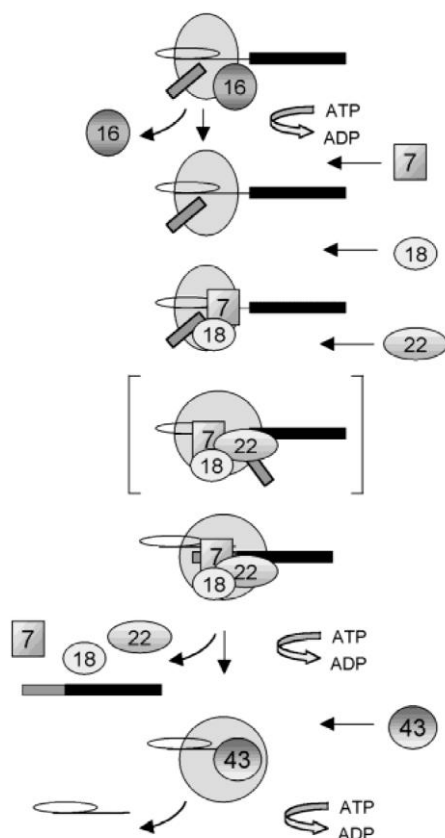
Druhý krok sestřihu pre-mRNA se odehrává ve dvou fázích, kdy první je na ATP závislá a působí při ní Prp16p a Prp17p, zatímco druhá fáze je na ATP nezávislá a vztahuje se na proteiny Slu7p, Prp18p a Prp22p (Schwer a Gross, 1998; Umen a Guthrie, 1995a). Za účasti hydrolyzy ATP RNA helikáza Prp16p katalyzuje konformační změny týkající se 3'sestřihového místa, které je posléze umístěno v katalytickém centru spliceosomu (Schwer a Guthrie, 1992). Možným cílem působení uvedené helikázy by mohly být helixy v rámci struktury U2/U6 snRNP, které podstupují částečné konformační změny (Schwer a Guthrie, 1991). Prp16p se váže k posledním čtyřem nukleotidům intronu a minimálně k dalším třinácti v následném exonu (McPheeters a Muhlenkamp, 2003). Protein Prp8 se váže před prvním katalytickým krokem minimálně k osmi nukleotidům exonu 1 a dalším třem intronu v 5'sestřihovém místě. Před druhou transesterifikační reakcí dochází následně i k interakci s oblastí intronu mezi branchpoint a 3'sestřihovým místem a pokrývá přilehlý úsek až přibližně k třináctému nukleotidu exonu 2, viz. obr. 2.10. (Teigelkamp *et al.*, 1995 a i b; McPheeters a Muhlenkamp, 2003).

Po prvním kroku RNA helikáza Prp16p interaguje s 3'sestřihovým místem a slaběji se váží proteiny Prp8 a Slu7. Hydrolyza ATP vyvolá konformační změnu, která sníží sílu vazby Prp16p a tato helikáza se následně uvolní. Konaformační přestavba naopak zvýší vazbu Prp8p a Slu7p k spliceosomu. Silnější interakce vyžaduje přítomnost dalších dvou proteinů, Prp17p a Prp18p, které pomáhají v stabilizaci vazby Slu7p (Umen a Guthrie, 1995a). Prp8p a Slu7p „uzamykají“ volný 5' konec exonu 1 v centru spliceosomu a drží 3'sestřihové místo v jeho těsné blízkosti (Collins a Guthrie, 2000). Prp17p (Slu4p) a Prp18p jsou neesenciální proteiny sestřihu, ale v případě delece obou genů dochází k částečné blokaci druhého kroku, zpomalení růstu buněk a jejich citlivosti ke zvýšené teplotě (Horowitz a Abelson, 1993; Jones *et al.*, 1995).



Obr. 2.10. Schematické znázornění sekvenčně nespécifické vazby mezi proteinem Prp8 a jednotlivými nukleotidy pre-mRNA *S. cerevisiae*.

Modře je zobrazena pre-mRNA, exony 1 a 2 jsou znázorněny v boxu, intronový úsek úzkou čarou. Žlutě podbarvená část představuje oblast vazby proteinu Prp8 ke katalytickému centru spliceosomu. Důležité nukleotidy, které se podílejí na vazbě, jsou označeny červeným a zeleným kruhem, kruh s červeným puntíkem uprostřed představuje nejvíce konzervovaná místa interakcí (převzato a upraveno dle Grainger a Beggs, 2005).



Obr. 2.11. Model postupné vazby faktorů druhého kroku sestřihu pre-mRNA k spliceosomálnímu komplexu.

Číselné označení představuje proteiny: 16-Prp16, 7-Slu7, 18-Prp18, 22-Prp22 a 43-Prp43

(převzato dle James *et al.*, 2002).

Poté následuje vazba Prp22p, proběhne druhý transesterifikační krok a dochází k uvolnění mRNA ze spliceosomu katalyzované jmenovanou RNA helikázou (Schwer a Gross, 1998; Wagner *et al.*, 1998). Vazba Prp22p je omezena na posledních osm nukleotidů intronu ve fázi před druhým krokem, tzn. ve fázi před ligací exonu 1 a 2 (McPheeters a Muhlenkamp, 2003). Strukturní změny související s transesterifikační reakcí pravděpodobně vyvolají i změnu interakce této helikázy a dochází k posunu vazby do oblasti přibližně třinácti nukleotidů exonu 2 těsně za rozhraní spojených exonů (Schwer, 2008). Doposud není blíže objasněno, působí-li protein Prp22 na přímou interakci faktoru Prp8p se sestřiženou mRNA nebo rozvolňuje spojení zmiňované oblasti s U5 snRNP, které je stabilizováno právě proteinem Prp8 (Schneider *et al.*, 2004; Tanaka s Schwer, 2005). Práce z roku 2007 podporuje druhou z hypotéz, kdy Prp22p katalyzuje přerušení vazby mezi U5 snRNP a mRNA (Aronová *et al.*, 2007). Zároveň s uvolněním mRNA dochází i k následné disociaci proteinů Slu7, Prp18 a Prp22. K zbývajícimu sestřihovému komplexu se v tento okamžik váže poslední sestřihová RNA helikáza Prp43p, která uvolňuje lariátovou strukturu a katalyzuje rozpad zbylého spliceosomálního komplexu (Martin *et al.*, 2002).

Předpokládá se, že proteiny Slu7, Prp18 a Prp22 tvoří kromě výše představených funkcí také spojovací „most“ případně stabilizují vazbu jiných faktorů k úseku mezi branchpoint a U5 snRNP v oblasti 3'sestřihového místa (Brys a Schwer, 1996; Schwer a Guthrie, 1992; Zhang a Schwer, 1997). Uvedená role je neesenciální *in vitro* při kratší vzdálenosti branchpoint a 3'sestřihového místa. Při vzdálenosti dvanácti a více nukleotidů je nezbytná přítomnost Slu7p a Prp18p, zatímco Prp22p je vyžadována až při vzdálenosti jednadvaceti a více nukleotidů. Prp18p zřejmě funguje jako spojovací článek mezi proteinem Slu7 a U5 snRNP a společně se pravděpodobně účastní vazby faktoru Prp22p, jehož interakce se spliceosomem je iniciována předchozí helikázou Prp16p (McPheeters *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2000; van Nues a Beggs, 2001; James *et al.*, 2002). Na vazbě nebo regulaci RNA helikázy Prp22p se zřejmě podílí i Prp45p (Albers *et al.*, 2003; Gahura *et al.*, přijato do tisku).

2.3.6 Vztah Prp45p k sestřihu pre-mRNA

Protein Prp45 je součástí tzv. penta snRNP sestřihového komplexu a byl zjištěn ve vysokomolekulárních frakcích obsahujících sestřihové proteiny (Stevens *et al.*, 2002; Ohi *et al.*, 2002). V roce 2003 byl nalezen při dvouhybridní studii jako významný vazebný faktor sestřihové RNA helikázy Prp22p a posléze byli identifikováni nejbližší interakční partneři Prp45p, viz. tab. 2.1. (Albers *et al.*, 2003).

Affinity capture-MS²	Brr2p, Prp17p (Cdc40p), Cef1p, Syf3p (Clf1p), Cwc2p, Cwc22p, Cwc23p, Hsh155p, Isylp, Lea1p, Prp11p, Prp19p, Prp21p, Prp43p, Prp46p, Prp8p, Rse1p, Snt309p, Snu114p, Spp382p (Ntr1p), Sto1p, Syf1p, Yju2p
Two hybrid³	Ade6p, Ahc1p, Apl1p, Bni1p, Cdc27p, Syf3p (Clf1p), Das1p, Dyn1p, Eaf3p, Ecm5p, Fir1p, Gsm1p, Mms22p, Mnt4p, Nfi1p, Ngg1p, Nis1p, Nup188p, Nup84p, Pkc1p, Prp22p, Prp46p, Rad16p, Rmd1p, Sec6p, Sgs1p, Skg3p, Ski3p, Sla2p, Spp382p (Ntr1p), Syf1p, Trp5p, Ubr2p, Vac14p, Vps75p, Yap1801p, Yta7p, YLR345W, YJR061W, YGR071C, YMR031C
Co-purification⁴	Prp19p
Reconstituted complex⁵	Prp46p

Tab. 2.1. Přehled fyzických interakčních partnerů proteinu Prp45.

Genetičtí interakční partneři nebyli pro Prp45p doposud zjištěni. Data byla získána z databáze Saccharomyces Genome Database (www.yeastgenome.org).

Pro Prp45p byla prokázána slabá interakce s U2, U5 a U6 snRNP, což naznačuje možný vstup do spliceosomu po uvolnění U1 a U4 snRNP (Alberts *et al.*, 2003). Lidský ortholog SKIP je vázán k sestřihovému komplexu právě před prvním katalytickým krokem po uvolnění obou zmiňovaných partikulí, U1 a U4 snRNP, viz. obr. 2.12 (Makarov *et al.*, 2002). Při izolaci komplexu faktorů asociovaných s Cef1/Cdc5 proteinem nebo některými dalšími faktory komplexu NTC (Prp19p, Cwc2p, Syf1p, Syf3p, Prp46p) byl prostřednictvím TAP-purifikace a hmotnostní

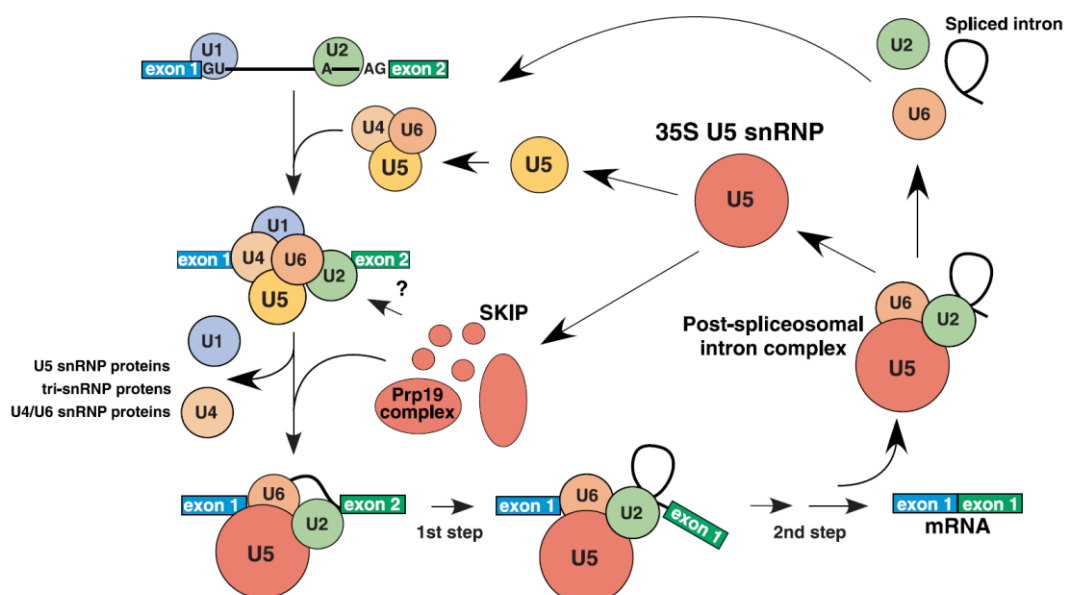
² Protein-návnada je afinitně vytažen z buněčného extraktu pomocí polyklonálních protilátek nebo za využití epitopového tagu. Asociované proteiny s proteinem-návnadou jsou poté identifikovány metodou MS.

³ Protein-návnada je fúzovaný s DNA-vazebnou doménou, protein-kořist (nejčastěji představuje knihovnu proteinů) je fúzovaný s DNA-aktivační doménou. Specifická interakce mezi těmito dvěma částmi umožní aktivaci transkripce určitého selekčního nebo detekčního genu.

⁴ Identifikace dvou či více podjednotek proteinového komplexu, který byl získán klasickou biochemickou frakcionací nebo afinitní purifikací s následnými frakcionačními kroky.

⁵ Interakce jsou určeny mezi purifikovanými proteiny *in vitro*.

spektrometrií identifikován i Prp45p (Ohi *et al.*, 2002; Gavin *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003). Kvasinkový i lidský komplex NTC je asociován se spliceosomem ve fázi, kdy dochází k vazbě lidského orthologního proteinu SKIP (Makarov *et al.*, 2002). Je pravděpodobné, že Prp45p není přímo interním proteinem komplexu NTC, ale dle výsledků dvouhybridní analýzy je blízce asociován s některými představiteli, Prp46p, Syf3p a Syf1p (Albers *et al.*, 2003). Podobně jako komplex NTC i Prp45p zůstává vázán se spliceosomem po oba kroky sestřihu pre-mRNA a byl detekován v postsestřihovém komplexu s intronem (Albers *et al.*, 2003; Chan *et al.*, 2003; Chan a Cheng, 2005).



Obr. 2.12. Sestavování ribonukleoproteinového spliceosomálního komplexu a průběh obou transesterifikačních reakcí sestřihu pre-mRNA.

Vstup lidského SKIP proteinu a komplexu NTC (komplexu asociovaného s faktorem Prp19p) je přisuzován fázi po uvolnění U1 a U4 snRNP (Makarov *et al.*, 2002).

Esencialita proteinu Prp45 vyplývá z účasti na sestřihu pre-mRNA, neboť vyřazením jeho exprese dochází k značné akumulaci nesestřižené pre-mRNA již po šesti až osmi hodinách a buňky kompletně pozastavují růst do dvanácti hodin (Alberts *et al.*, 2003). Různá délka mezi oblastí větvení s branchpoint a 3'sestřihovým místem (analyzovány vzdálenosti sedmi a třicetidevíti nukleotidů) nemá vliv na postradatelnost Prp45p pro sestřih (Albers *et al.*, 2003). Při studiu sestřihu pre-mRNA *in vivo* se nejčastěji využívá přístupu, který je založen na analýze vzájemného poměru množství výchozí

pre-mRNA, meziproduktu sestřihu (lariát-exon 2) a mRNA. Na základě určeného poměru pomocí detekce metodou primer extension lze usuzovat o fázi působení mutantní alely sestřihového faktoru (Liu *et al.*, 2007). Substrátem při analýze je fúzní konstrukt *ACT1-CUP1* obsahující intron v genu pro aktin (*ACT1*), který nese různé změny konzervovaných úseků v okolí 5' a 3' sestřihových míst a také v oblasti branchpoint (Lesser a Guthrie, 1993). Pro *prp45(1-169)* byla prokázána v porovnání s divokou alelou *PRP45* snížená schopnost sestřihu některých suboptimálních konstruktů (Gahura *et al.*, přijato do tisku). Ze získaných výsledků vyplývá, že Prp45p se může podílet na prvním kroku sestřihu zejména ve vztahu k oblasti větvení s branchpoint, ale také představuje nezbytnost pro řádný průběh druhého kroku sestřihu. Pro lidského zástupce SKIP bylo potvrzeno, že se podílí na přednostním výběru řádných sestřihových míst před aberantními (Nagai *et al.*, 2004).

2.3.7 Průběh spliceosomálního cyklu, recyklace sestřihových faktorů

Rozvolnění zbylého spliceosomálního komplexu po uvolnění sestřižené mRNA a recyklace faktorů pro opětovné sestavení spliceosomu vyžaduje přítomnost dvou RNA helikáz/ATPáz Brr2p a Prp43p (Martin *et al.*, 2002; Tsai *et al.*, 2005).

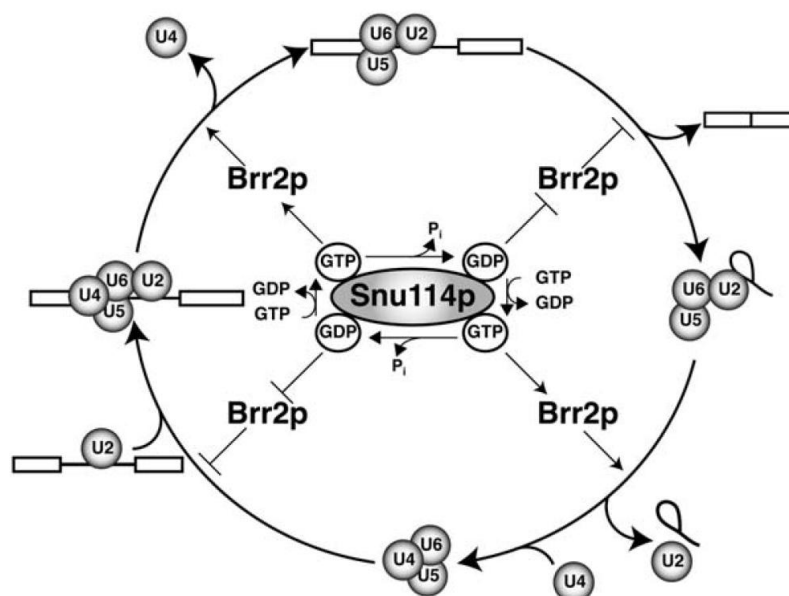
Kromě energie získané hydrolýzou ATP je důležitá pro průběh sestřihu pre-mRNA i přítomnost energetického substrátu GTP, který je vyžadován pro esenciální sestřihový faktor a GTPázu Snu114 (Fabrizio *et al.*, 1997; Bartels *et al.*, 2003; Brenner a Guthrie, 2005). Snu114p vykazuje homologii s prokaryotním i eukaryotním ribosomálním elongačním faktorem EF-G/eEF-2 (Fabrizio *et al.*, 1997). Tento protein působí při sestřihu pre-mRNA zejména jako signální G-protein, který prostřednictvím RNA helikázy Brr2p kontroluje dynamiku spliceosomu (Small *et al.*, 2006). Snu114p aktivuje sestavování i rozpad ribonukleoproteinového komplexu v závislosti na vazbě GTP/GDP. S navázaným GTP ovlivňuje prostřednictvím Prp8p aktivitu RNA helikáz Brr2p a pravděpodobně i Prp28p, které rozvinují vazbu mezi U4 a U6 snRNA a uvolňují U1 snRNP ze spliceosomu. Přímá vazba Snu114p byla potvrzena pouze s faktorem Prp8p (van Nues a Beggs, 2001). Po hydrolýze GTP vyvolávající vnitřní strukturní přestavby Snu114p dochází ke změně charakteru vazby k Prp8p, které posléze vyvolají jeho konformační přestavbu (Brenner a Guthrie, 2005). Protein Prp8 reguluje funkci RNA helikáz Brr2p a Prp28 a brání jejich předčasné aktivaci, ale změna povahy vazby Snu114p k Prp8p

přeruší jeho inhibiční efekt (Kuhn *et al.*, 2002; Brenner a Guthrie, 2005 a 2006). Také se zdá, že stabilita a schopnost vazby proteinu Prp8 k U5 snRNP je závislá na předešlé interakci se Snu114p (Brenner a Guthrie, 2006).

Doposud se přesně neví, jakým způsobem dochází k regulaci této GTPázy, neboť pouze Snu114p vázaný s GTP je schopen aktivovat prostřednictvím proteinu Prp8 RNA helikázu Brr2p. Jedním z možných kandidátů je komplex NTC a jeho centrální faktor Prp19p, který vykazuje E3 ubiquitin ligázovou aktivitu *in vitro*, a Snu114p byl nalezen v polyubiquitovaném stavu (Ohi *et al.*, 2003; Peng *et al.*, 2003). Očekává se, že Prp19p může zabraňovat aktivaci proteinu Snu114 na základě jeho polyubiquitinace. Deubiquitinace je pravděpodobně zprostředkována proteinem Sad1, který obsahuje C-koncovou doménu podobnou ubiquitin hydroláze, ubiquitin C-terminal hydrolase (UCH)-like domain, a je v genetickém vztahu se Snu114p (Brenner a Guthrie, 2005). Prp8p nese Jab/MPN doménu vykazující vazebnou schopnost k ubiquitinu, která je esenciální pro funkci tohoto sestřihového proteinu (Bellare *et al.*, 2006; Small *et al.*, 2006). Protein Prp8 pravděpodobně propojuje Snu114p s Prp19p a Sad1p (Small *et al.*, 2006).

Komplex NTC vstupuje do procesu sestřihu pre-mRNA ve fázi po uvolnění U1 a U4 snRNP, tedy v době, kdy RNA helikázy Brr2p a Prp28p již rozvolnily vazbu mezi U4 a U6 snRNA a došlo k uvolnění U1 snRNP. S proteinem Prp19 asociovaný komplex poté pravděpodobně „vyřadí“ z funkce GTPázu Snu114p polyubiquitinylací (Brenner a Guthrie, 2005; Small *et al.*, 2006). Z postsestřihového uspořádání je komplex NTC uvolněn RNA helikázou Prp43p a v této fázi je faktor Snu114p patrně uveden do aktivního stavu deubiquitinací Sad1 proteinem a následnou vazbou GTP. GTPáza posléze opět pozmění svoji vazbu k Prp8p, který vlivem vnitřní přestavby přestane inhibovat rozvolnění interakce U2 a U6 snRNA katalyzované Brr2p (Chan *et al.*, 2003; Chan a Cheng, 2005; Brenner a Guthrie, 2006; Small *et al.*, 2006). Protein Prp8 je vázán do spliceosomu s tri-U4/U6.U5 snRNP, zůstává přítomen po oba kroky sestřihu a byl identifikován jako součást postsestřihového komplexu. Z hlediska sestřihu pre-mRNA je jediným faktorem, který se váže ke všem třem konzervovaným sekvencím (5' a 3'sestřihové místo a oblast větvení s branchpoint) a zároveň interaguje i s U5 a U6 snRNA (Brown a Beggs 1992). Faktory Snu114p a Prp8p asociují s U5 snRNP, která váže oblast 5'sestřihového místa (Newman *et al.*, 1995; Dix *et al.*, 1998). Vnitřní změna U5 snRNP po interakci s exonem 1 může aktivovat

funkci Snu114p, neboť bylo potvrzeno, že vazba GTP je významně zvýšena v přítomnosti RNA (Bartels *et al.*, 2003). Nedávno objevená role komplexu NTC při znovuoobnovení vazby U4/U6 snRNA za účasti RNA vazebného proteinu Prp24 a heptameru Lsm faktorů (Lsm2-Lsm8) předešlé domněnky o jedné z funkcí komplexu NTC, tedy recyklační funkci, částečně podporuje (Raghubathan a Guthrie, 1998; Achsel *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2006). RNA helikáza Brr2p rozvolní postsetřihové uspořádání U2/U6 snRNP a uvolnění U5 snRNP od intronu potlačí asociaci GTP k Snu114p. V novém cyklu skládání spliceosomu komplex NTC umožní nepřímo opětovné vytvoření U4/U6 snRNP, které je posléze rozvolněno ve fázi po asociaci tri-U4/U6.U5 snRNP k pre-mRNA aktivovanou helikázou Brr2p (Small *et al.*, 2006).



Obr. 2.13. Role proteinu Snu114 v rámci cyklu sestavení a rozpadu spliceosomu. Vlevo je stručně zobrazeno sestavování spliceosomu, nahoře průběh sestřihu pre-mRNA a vpravo rozvolnění postsetřihového komplexu. Snu114p představuje faktor, který s navázaným GTP zprostředkovává přes protein Prp8 aktivaci RNA helikázy Brr2p a v GDP stavu naopak potlačuje její funkci. Aktivovaný enzym Brr2p katalyzuje sestavení nebo rozvolnění spliceosomu (převzato dle Small *et al.*, 2006).

Protein Prp45 i lidský zástupce SKIP jsou úzce asociovány s komplexem NTC a na základě výsledků purifikace s užitím konstruktů GST-SKIP byly nalezeny i některé sestřihové faktory, zejména však všechny výše jmenované, hPrp8, hPrp28, h200K (ortholog u *S. cerevisiae* Brr2p) a h116K (ortholog u *S. cerevisiae* Snu114p)

(Makarov *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003). V *S. cerevisiae* se podařilo prokázat dvouhybridní analýzou vazbu Prp45p s proteinem Ntr1, který je odpovědný za regulaci a specifickou interakci recyklační RNA helikázy Prp43p se zbylým spliceosomálním komplexem ve fázi po uvolnění mRNA (Albers *et al.*, 2003). Druhý ze tří faktorů tvořících NTR komplex (heterotrimer Ntr1p, Ntr2p a Prp43p) Ntr2p prostřednictvím Brr2p spojuje Prp43p s U5 snRNP (Tsai *et al.*, 2005 a 2007; Tanaka *et al.*, 2007). Izolaci buněčných komplexů přístupem afinitní chromatografie byly identifikovány jako součást subkomplexního uspořádání s Prp45p všechny zmíněné faktory, Prp8p, Snu114p, Brr2p, Prp43p a Ntr1p. O možné roli komplexu NTC, případně i Prp45p/SKIP, ve vztahu k regulaci recyklace spliceosomálního komplexu není dnes více známo.

2.4 Modelový organismus *S. cerevisiae*

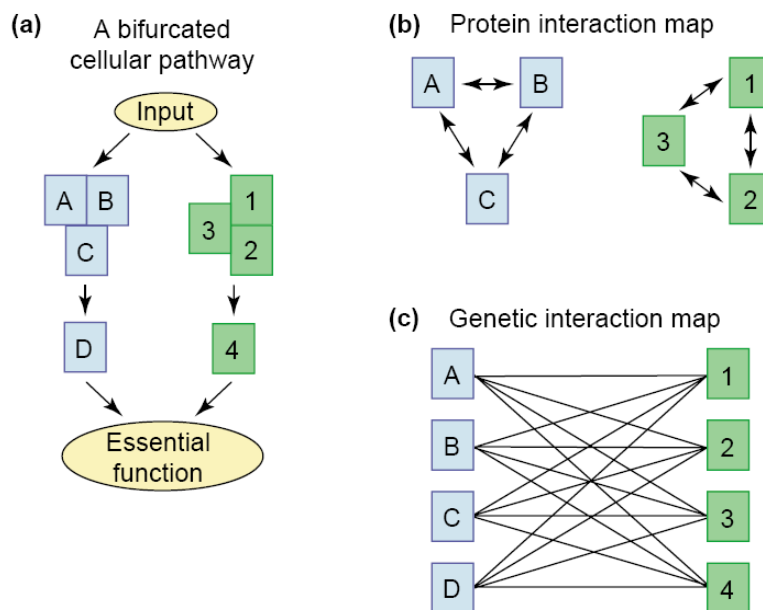
Genom *S. cerevisiae* je tvořen 16 chromosomy, které obsahují přes 6000 genů oddělených krátkými nekódujícími oblastmi. Předpokládá se, že proteiny kóduje 5885 genů, zbytek je tvořen 140 geny pro ribosomální RNA, 40 geny pro malé jaderné RNA a 275 genů dává vznik různým transferovým RNA (Goffeau *et al.*, 1996).

Zhruba 18% genů *S. cerevisiae* (1105 genů ze zhruba 6000) je esenciálních při růstu na médiu bohatém na živiny a obsahujícím glukózu (Giaever *et al.*, 2002). Uvedená hodnota pravděpodobně odpovídá reálnému množství genů, které jsou potřebné pro průběh životně důležitých procesů odehrávajících se v buňce za „normálního“ stavu vnitřního i vnějšího prostředí. Malá část ze zbylých genů se stává esenciální např. při růstu za podmínek pro buňku „nepřirozených“. Další významnou skupinu tvoří geny, jejichž proteinové produkty účinkují např. ve vzájemně zastupitelných buněčných drahách. Dojde-li k závažnému poškození některého člena, které vede k vyřazení celé jedné dráhy či její části z funkce, stávají se zástupci paralelní dráhy zcela esenciálními a nezbytnými k přežití.

2.4.1 Genetické interakce při studiu buněčné komplexity

Při studiu buněčných procesů se využívá nejčastěji přístupů, které jsou založeny na hledání interakčních partnerů v rámci fyzické či genetické úrovně. Fyzické interakční mapy jsou založeny pouze na přímých protein-proteinových interakcích, obvykle bez jakékoliv znalosti funkce proteinu. Naproti tomu stav genetické interakce

nastává mezi dvěma geny, kdy jejich proteinové produkty působí ve vzájemně zastupitelných paralelních drahách (metabolických či signálních), nebo jsou přítomny v jedné esenciální dráze (Tucker a Fields, 2003). Mezi proteiny kódovanými geny s genetickou interakcí může i nemusí docházet k fyzické interakci. Naopak často tyto proteiny působí v různých vzájemně oddělených buněčných kompartmentech.



Obr. 2.14. Genetické a fyzické interakční mapy (Ooi *et al.*, 2006).

a) Proteiny A, B, C a D (označeny modře) a proteiny 1, 2, 3 a 4 (označeny zeleně) jsou členy dvou paralelních a vzájemně zastupitelných buněčných drah, kdy výsledný produkt či proces z nich vyplývající je pro buňku zcela esenciální. b) Fyzické interakce mezi proteiny založené na přímých vazbách. c) Genetické interakce nemusí vyžadovat přímou vazbu mezi proteiny ani podobnou lokalizaci v rámci buněčných kompartmentů.

Výsledky genetických interakčních drah společně se znalostmi z protein-proteinových vazebných analýz a mRNA expresních profilů pomáhají odhalit a lépe pochopit jednotlivé vztahy v rámci složitých biologických procesů. Mnohé buněčné děje jsou fylogeneticky vysoce konzervované a jejich bližší charakterizace u modelového eukaryotního organismu *S. cerevisiae* usnadňuje porozumění vzniku a průběhu některých závažných onemocnění vyšších eukaryot. Odhaduje se, že přes 30% genů, které byly nalezeny u člověka v souvislosti se vznikem onemocnění, má své homologní zástupce i v kvasince *S. cerevisiae* (Ooi *et al.*, 2006).

K nejvýznamnějším přístupům studia genetických vztahů *S. cerevisiae* náleží analýzy dosage rescue, phenotypic enhancement, phenotypic suppression, synthetic growth defect, synthetic lethality a synthetic rescue (převzato z Saccharomyces Genome Database, www.yeastgenome.org).

Stručná charakterizace jednotlivých genetických vztahů:

dosage rescue

= protein suprimuje lethální efekt delece jiného genu, dochází-li k jeho nadprodukcí

phenotypic enhancement

= mutace nebo nadprodukce určitého genu způsobí zesílení fenotypu spojeného s mutací nebo nadprodukcí genu jiného

phenotypic suppression

= mutace či nadprodukce jednoho genu nahrazuje fenotypové projevy mutace nebo nadprodukce genu druhého (odlišné od synthetic lethality/synthetic growth defect)

synthetic growth defect

= mutace v odlišných genech, kdy každý jimi produkovaný protein sám o sobě způsobuje minimální fenotyp, zapříčiní závažný růstový defekt při kombinaci obou těchto mutací

synthetic lethality

= je situace, kdy kombinace dvou mutací je pro buňku lethální, přestože samotný výskyt každé z nich lethality nezpůsobí

synthetic rescue

= mutace nebo delece jednoho genu zachrání buňku nesoucí jinak lethální mutaci nebo deleci genu jiného

2.4.2 Synthetická lethality představuje významný model pro studium genetických interakcí

Synthetická lethality je stav genetické interakce, který nastává mezi dvěma nebo více mutovanými geny, jejichž kombinace vyústí v neživotaschopnost buňky, ale jednotlivé mutace zvlášť lethality nezpůsobí. Fenomén synthetické lethality byl poprvé popsán v *D. melanogaster* a název pochází z roku 1946 (Bridges, 1922; Dobzhansky, 1946; obě citace převzaty z Lucchesi, 1968).

Při identifikaci syntheticky lethálních interakčních partnerů se využívá několika různých metod. Na úrovni celogenomového vyhledávání se v posledních letech hojně

uplatňují přístupy Synthetic genetic array (SGA; Tong *et al.*, 2001) a Synthetic lethality analysis by microarray (SLAM; Ooi *et al.*, 2003). Obě zmíněné metody pracují s YKO mutantami (YKO: yeast knockout mutants, shrnuto v Ooi *et al.*, 2006). Celogenomové analýzy jsou prozatím omezeny pouze na neesenciální geny, ale v nejbližších letech se předpokládá rozšíření i o geny esenciální s využitím jejich mutovaných forem. Mezi nejvíce uplatňovanou metodu syntheticky lethálních studií patří Plasmid dependence assay (Basson *et al.*, 1987; shrnuto v Koren *et al.*, 2003).

Metoda Plasmid dependence assay je na plazmidu závislá studie. Přežití stavu synthetické lethality je možné jen na základě přítomnosti divoké alely jednoho z mutovaných genů. Proto je použit plazmid, který nese neovlivněnou verzi genu, jehož mutovaná varianta se nachází v genomu a k níž syntheticky lethální partnery hledáme. Studium synthetické lethality uvedeným postupem lze uplatnit pro geny esenciální i neesenciální. Je-li gen, jehož syntheticky lethální partnery hledáme, neesenciální, lze použít kompletní chromosomální delecí. V druhém případě, tedy esenciality studovaného genu, je nutné připravit mutovanou variantu. Obvykle se generují jedno nebo více nukleotidové záměny ve struktuře DNA způsobující změnu v kódování aminokyselinových zbytků. Další možnosti představují částečné delece genu založené např. na homologní rekombinaci selekčních kazet, PCR-mediated gene disruption strategy (např. Baudin *et al.*, 1993; Wach *et al.*, 1994; Lorenz *et al.*, 1995). Poslední zmíněný přístup se využívá často i k tvorbě chromosomální delece neesenciálního genu. Vytvořené mutace mohou ovlivňovat např. rychlost růstu, případně způsobovat určitý morfologický nebo funkční fenotyp projevující se za specifických podmínek.

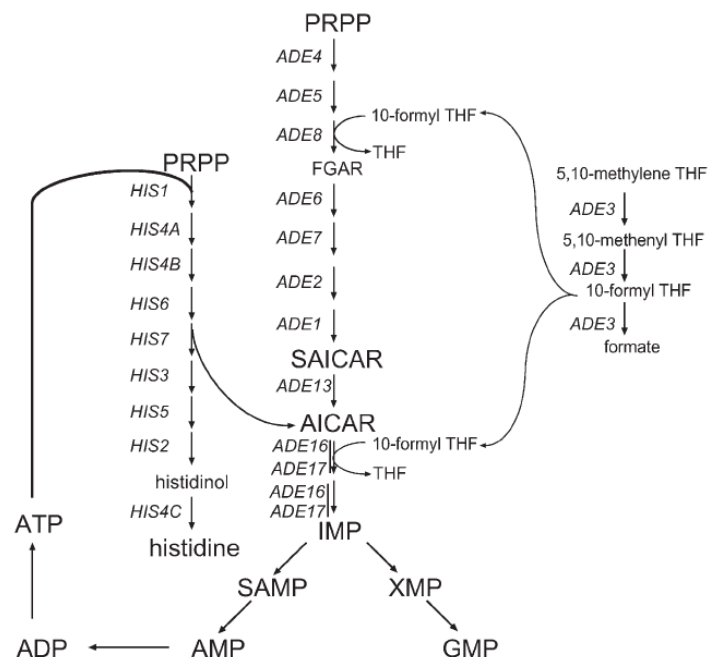
Plazmid, který je používán při studii synthetické lethality, je centromerického typu a jeho ztráta za neselekčních podmínek je podpořena narušením centromerické oblasti. Během mitotického dělení není segregace plazmidu rovnoměrná a častěji dochází k jeho vymizení z rostoucí populace buněk. Vznikne-li vztah synthetické lethality mezi mutací studovanou a náhodně vytvořenou v jiném genu, budou buňky vykazovat životní závislost na plazmidu. Náhodné mutace jsou nejčastěji generovány chemickým přístupem (EMS, ethyl methansulfonát nebo N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin) či UV mutagenezí.

Pro relativně snadnou identifikaci mutantních buněk ve vztahu synthetické lethality se využívá možnosti sledování přítomnosti plazmidu na základě vizuálního

pozorování změn v zabarvení kolonií, The colony color assay, neboli systém *ADE2/ADE3* (Hieter *et al.*, 1985; Koshland *et al.*, 1985). Poprvé byl barevný projev pozorován v roce 1956 při studiu vlivu mutací na buněčný fenotyp (Roman, 1956; převzato z Koren *et al.*, 2003). Mutace v genu *ADE1* nebo *ADE2* vyvolává akumulaci červeného pigmentu ve vakuolách. Červené zabarvení způsobuje intermediát P-ribosyl-amino-imidazol (AIR), meziprodukt biosyntetické dráhy tvorby inosinmonofosfátu (IMP) a substrát pro enzym AIR-karboxylázu kódovanou genem *ADE2* (Jones a Fink, 1982; převzato z Koren *et al.*, 2003 a Rébora *et al.*, 2005).

ADE3 gen kóduje trifunkční cytoplasmatickou C1-tetrahydrofolátsyntázu, která katalyzuje tři po sobě jdoucí reakce vedoucí k tvorbě formátu (viz. obr. 2.15). Nejdůležitějším produktem v sérii tří reakcí je druhý meziprodukt 10-formyl tetrahydrofolát (10-formyl THF), který je významným kosubstrátem pro třetí a devátý krok při biosyntéze IMP. Nevzniká-li 10-formyl THF, je tato biosyntetická dráha blokována po druhém kroku a v buňkách nevzniká červený produkt AIR.

V roce 1985 byl systém The colony color assay poprvé aplikován při genetických analýzách ztráty chromosomů během mitózy *S. cerevisiae* (Koshland *et al.*, 1985). Buňky byly transformovány minichromosomy nesoucími právě gen *ADE3* na pozadí kmene s *ade2/ade3* genotypem. Ztráta minichromosomů se projevila tvorbou bílých sektorů na červených koloniích. Druhou skupinou, která zavedla využití tohoto systému do praxe, byla laboratoř, kde monitorovali opět stabilitu mitotických chromosomů *S. cerevisiae* v závislosti na velikosti studovaného chromosomu, přítomnosti centromerické oblasti a ARS sekvenci (Hieter *et al.*, 1985). Uměle připravený chromosom nesl ochre-suprimující formu genu pro tRNA, *SUP11*. U homozygotního diploidního kmene s ochre mutací v genu *ADE2* se nepřítomnost testovaného chromosomu projevila tvorbou červených kolonií. Ztráta uměle konstruovaného chromosomu vedla k tvorbě červených sektorů (*ADE3/ade2* genotyp) na původně bílých koloniích.



Obr. 2.15. Schematické zjednodušené znázornění biosynetické dráhy vzniku purinů a histidinu (převzato dle Rébora *et al.*, 2005).

V případě užití systému *ADE2/ADE3* pro studium synthetické lethality přístupem Plasmid dependence assay je využíváno u kvasinkového kmene genetického pozadí *ade2/ade3*. Gen, jehož syntheticky lethální interakční partnery hledáme, je umístěn na plazmidu spolu s *ADE3* genem (buňky transformované plazmidem jsou červeného zbarvení). Nevznikne-li po ozařování, případně chemické mutagenезi vztah synthetické lethality mezi mutací v genu studovaném a neznámém, ztráta plazmidu se projeví tvorbou bílých sektorů na červených koloniích. Identifikace neznámého genu je založena na ztrátě závislosti na přítomnosti divoké alely studovaného genu při transformaci mutantních buněk genomovou knihovnou.

3. Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Seznam použitých organismů

Escherichia coli

kmen **DH5α**: $\phi 80dlacZ\Delta M15$ *recA* *gyrA96* *thi-1* *hsdR17* (r_K^- , m_K^+) *supE44* *relA1* *deoR*
 $\Delta(lacZYA-argF)U169$ (Stratagene, USA)

kmen **DH5α-T1^R**: $F^+ \phi 80dlacZ\Delta M15$ $\Delta(lacZYA-argF)U169$ *deoR* *recA1* *endA1* *hsdR17*
(r_K^- m_K^+) *phoA* *supE44* *thi-1* *gyrA96* *relA1* *tonA* (Invitrogen, USA)

Saccharomyces cerevisiae

kmen **FPY4B**: *MATa prp45(1-169)-HA::kanMX6 ade2 ade3 his3 leu2 ura3*

kmen **GRF18**: *MATa his3-11 his3-15 leu2-3 leu2-112 can^R*

kmen **JB**: *MATa ade2 ade3 his3 leu2 trp1 ura3*

kmen **AVY02**: *MATa prp45(1-169)-HA::kanMX6 ade2 his3 leu2 trp1 ura3*

kmen **AVY11**: *MATa prp45(1-169)-HA::kanMX6 ade2 ade3 his3 leu2 trp1 ura3*

kmen **w303-1a**: *MATa ade2-1 his3-1,115 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100*

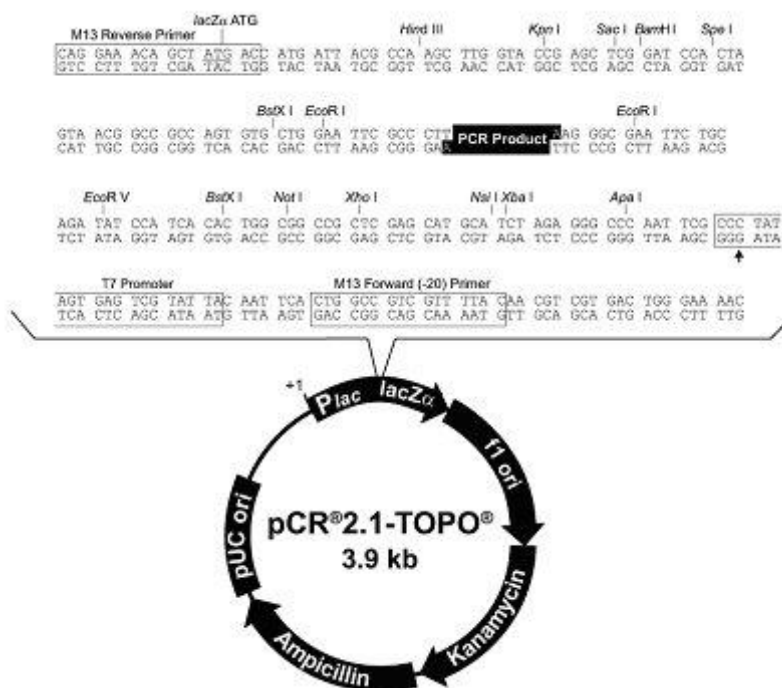
kmen **PLAS1-6A**: *MATa his4d29 ura3-52*

kmen **PLAS1-7D**: *MATa his4d29 ura3-52*

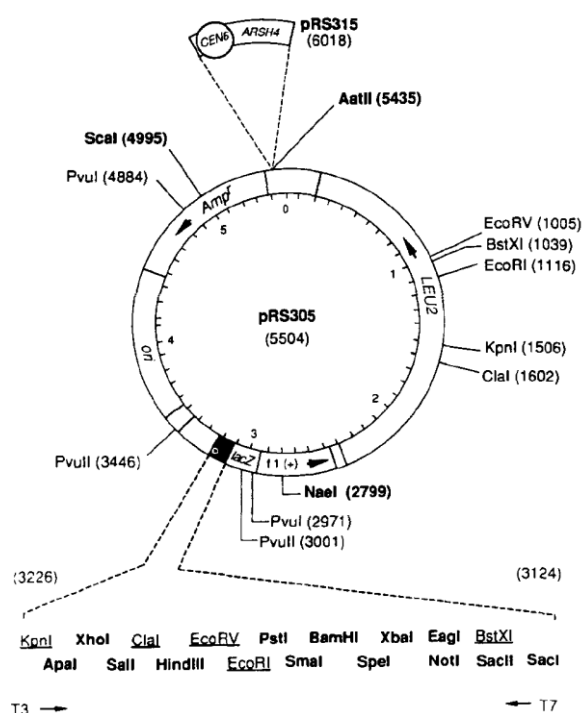
kmen **#94500** *MATa/α prp45Δ0::kanMX4/PRP45 his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0*
(BY4743, diploid): *lys2Δ0/LYS2 MET15/met15Δ0 ura3Δ0/ura3Δ0*

kmen **#94500-h** *MATa prp45Δ0::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 trp1 ura3Δ0*
(haploid): plazmid p416ADH-PRP45

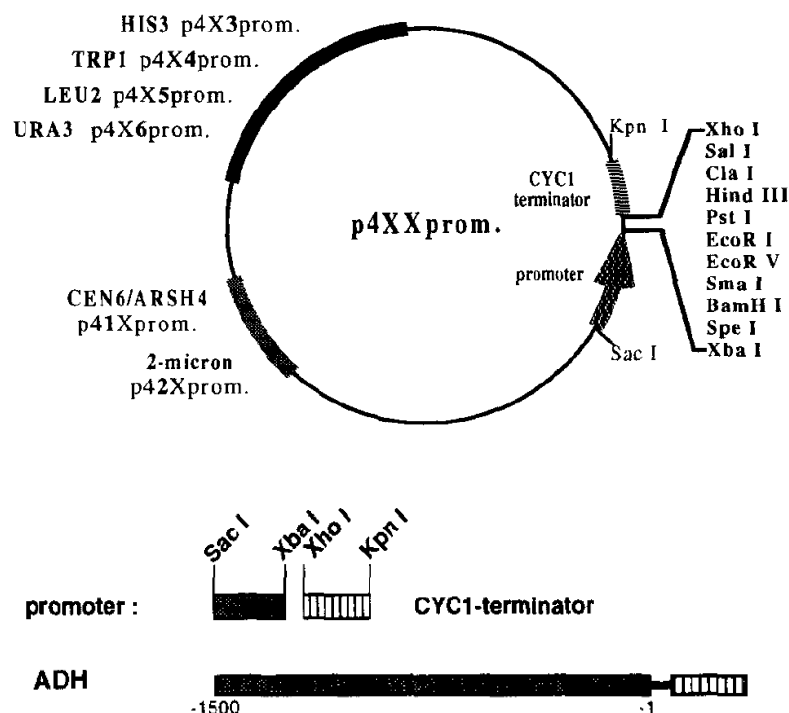
3.1.2 Použité vektory a plazmidy pro klonování



Vektor **pCR 2.1 TOPO**, který je součástí soupravy TOPO TA Cloning (Invitrogen, USA) určené pro vkládání produktů PCR.



Zobrazení vektoru **pRS315** (6 018 bp), tučně jsou zvýrazněna unikátní restrikční místa (Sikorski a Hieter, 1989).



MCS for expression vectors

Plasmid ^a	Marker gene	Restriction sites (in MCS) ^b
p4X3	<i>HIS3</i>	<i>XbaI SpeI BamHI SmaI EcoRV EcoRI</i> <i>PstI HindIII ClaI SalI XhoI</i>
p4X4	<i>TRP1</i>	<i>XbaI SpeI BamHI SmaI EcoRV EcoRI</i> <i>PstI HindIII ClaI SalI XhoI</i>
p4X5	<i>LEU2</i>	<i>XbaI SpeI BamHI SmaI EcoRV EcoRI</i> <i>PstI HindIII ClaI SalI XhoI</i>
p4X6	<i>URA3</i>	<i>XbaI SpeI BamHI SmaI EcoRV EcoRI</i> <i>PstI HindIII ClaI SalI XhoI</i>

Přehled restrikčních míst v oblasti polylinkeru (multiple cloning sites). Unikátní místa jsou znázorněna tučně, restrikční místo *XbaI* je unikátní pouze u centromerické série p41X (Mumberg *et al.*, 1995).

použité vektory:

- vektor **p416ADH** (ADH promotor a CYC1 terminátor, velikost 6 647 bp)
- vektor **p423ADH** (ADH promotor a CYC1 terminátor, velikost 7 560 bp)

3.1.3 Přehled použitých vektorů a plazmidů určených k transformacím mutantních klonů

vektor/plazmid	nesené geny	selekce	typ	původ
pRS315	-	<i>LEU2, amp^R</i>	cen	Sikorski a Hieter, 1989
pRS326	-	<i>URA3, amp^R</i>	2μ	Sikorski a Hieter, 1989
pHT4467Δ	<i>ADE3</i>	<i>URA3, amp^R</i>	cenΔ	Bassler <i>et al.</i> , 2001/ O. Gahura
YEpl3/YEpl3-lib.	genom. knihovna	<i>LEU2, amp^R</i>	2μ	Nasmyth a Tatchell, 1980
pOG02	<i>PRP45, ADE3</i>	<i>URA3, amp^R</i>	cenΔ	Gahura <i>et al.</i> , přijato do tisku/O. Gahura
pAV01	<i>prp45(1-168)</i>	<i>HIS3, amp^R</i>	2μ	-
pAV02	<i>ADE3</i>	<i>LEU2, amp^R</i>	cen	-
pAV03	<i>URA3</i>	<i>LEU2, amp^R</i>	cen	-
pAV04	<i>COF1, FRE6</i>	<i>LEU2, amp^R</i>	cen	-
pAV05	<i>NTC20</i>	<i>LEU2, amp^R</i>	cen	-
pAV06	<i>COF1</i>	<i>LEU2, amp^R</i>	cen	-
YEpl3-PRP45	<i>PRP45</i>	<i>LEU2, amp^R</i>	2μ	Nasmyth a Tatchell, 1980/ O. Gahura
p416ADH-FUN20 ΔC5	<i>prp45(1-168)</i>	<i>URA3, amp^R</i>	cen	Gahura <i>et al.</i> , přijato do tisku/K. Abbrámová
p416ADH-PRP45	<i>PRP45</i>	<i>URA3, amp^R</i>	cen	Gahura <i>et al.</i> , přijato do tisku/K. Abbrámová
YEpl3-#3-7	<i>SYF3</i>	<i>LEU2, amp^R</i>	2μ	Nasmyth a Tatchell, 1980/ O. Gahura
pSE358-SLU7	<i>SLU7</i>	<i>TRP1, amp^R</i>	cen	Zhang a Schwer, 1997/ B. Schwer
YEpl3-#2-8	<i>SLU7</i>	<i>LEU2, amp^R</i>	2μ	Nasmyth a Tatchell, 1980/ O. Gahura
pDBY419-PRP17	<i>PRP17</i>	<i>TRP1, amp^R</i>	cen	M. Kupiec
pSE358-PRP22	<i>PRP22</i>	<i>TRP1, amp^R</i>	cen	Schwer a Meszaros, 2000/ B. Schwer
pRS414-CEF1	<i>CEF1</i>	<i>TRP1, amp^R</i>	cen	Ch. Guthrie
pGBT9-SNT309	<i>SNT309</i>	<i>TRP1, amp^R</i>	cen	Ohi a Gould, 2002/ K. L. Gould
pGAD424-SYF1	<i>SYF1</i>	<i>LEU2, amp^R</i>	2μ	Ohi a Gould, 2002/ K. L. Gould
pGBT9-SYF1	<i>SYF1</i>	<i>TRP1, amp^R</i>	cen	Ohi a Gould, 2002/ K. L. Gould
pGAD424-CWC2	<i>CWC2</i>	<i>LEU2, amp^R</i>	2μ	Ohi a Gould, 2002/ K. L. Gould
pGAD424-PRP19	<i>PRP19</i>	<i>LEU2, amp^R</i>	2μ	Ohi a Gould, 2002/ K. L. Gould
pGAD424-PRP46	<i>PRP46</i>	<i>LEU2, amp^R</i>	2μ	Ohi a Gould, 2002/ K. L. Gould
pMK8-5-PRP8	<i>PRP8</i>	<i>HIS3, amp^R</i>	2μ	M. M. Konarska
pSE358-PRP16	<i>PRP16</i>	<i>TRP1, amp^R</i>	cen	Burgess a Guthrie, 1993/ Ch. Guthrie
pAS2.1-PRP18	<i>PRP18</i>	<i>TRP1, amp^R</i>	cen	M. Kupiec

3.1.4 Přehled použitých enzymů modifikujících DNA

Ligace DNA:

T4 DNA ligáza (#EL0015; MBI Fermentas, Litva): 1 U/ μ l

10× reakční pufr (#B69; MBI Fermentas, Litva): 400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP, pH 7,8 při 25°C

DNA polymerázy pro PCR:

Taq polymeráza (#EP0402; MBI Fermentas, Litva): 5 U/ μ l

10× reakční pufr s KCl: 100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 0,8% Nonidet P40, pH 8,8 při 25°C

Expand High Fidelity polymeráza

(#11732641001; Roche-Boehringer Mannheim, BRD): 100 U/ 30 μ l

10× reakční pufr: 100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, pH 8,3 při 25°C

Štěpení DNA restrikčními endonukleázami:

enzym	výrobce
BamHI (#ER0051)	MBI Fermentas
EcoRI (#ER0271)	MBI Fermentas
Eco32I (#ER0301, <i>EcoRV</i>)	MBI Fermentas
HindIII (#ER0501)	MBI Fermentas
NotI (#ER0591)	MBI Fermentas
NsiI (#ER0731, <i>Mph1103I</i>)	MBI Fermentas
PstI (#ER0611)	MBI Fermentas
SacI (#R0156S)	New England BioLabs
SalI (#1080S)	TaKaRa
ScaI (#ER0431)	MBI Fermentas
XbaI (#ER0681)	MBI Fermentas
XhoI (#ER0691)	MBI Fermentas

poznámka: Reakční pufr pro jednotlivé restrikční endonukleázy a kombinaci štěpení dvěma různými enzymy byly zvoleny dle doporučení výrobce (viz. www.fermentas.com, www.takara-bio.com a www.neb.com).

3.1.5 Použité kity pro manipulaci s nukleovými kyselinami

Klonování DNA:

TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen, UK)

Purifikace DNA:

NucleoSpin[®] Extract 2 in1 (Macherey-Nagel, BRD)

NucleoSpin[®] Extract II (Macherey-Nagel, BRD)

NucleoSpin[®] Plasmid (Macherey-Nagel, BRD)

3.1.6 Seznam použitých primerů

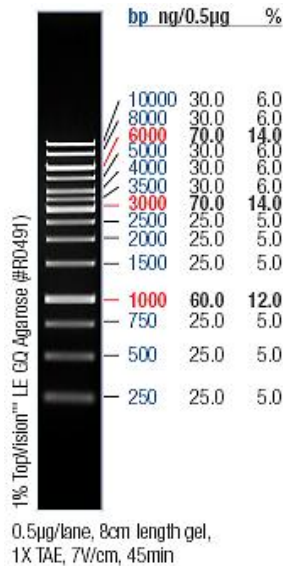
primer	sekvence	délka (bp)
KM01	GCTGAATTCATGGATCCATTGTTGCC ⁶	17/26
FP22	CAGATCTCACAGCTGCAGGTATC ¹	16/23
KM02	GCTGAATTCATGCTATCGGTTTCCTTTGCC ¹	17/29
PL03	GAAGCTCGAGCTAAAGAGCTTTACCTACAC ¹	17/29
AV01	GCTTTTCAATTCAATTCATC	20
AV02	CCGCAGGGTAATAACTGA	18
AV05	TATTCGCACTACGAAGC	18
AV06	CATTTTCATATTTCTTGCC	19
AV07	ACAACAACGAGACGAGAC	18
AV08	ATTTTCATTGTAAAATGCGG	19
AV09	AATCTCTCAGGCACAGGC	18
AV10	AGGTTAGCGTTACTCTGTG	19
AV11	CAAACCTCCTTTGGTAGAGGC	21
AV12	ATTCAACGAGCTATGGTCGTC	21
AV13	TGAGATGGTTTGTAACCGTATTC	23
AV14	GTTGCTTAGTCTTAGTTGTCTTG	23

poznámka: Sekvenčně přesná lokace primerů BR-B1 a P1 není známa, primery byly navrženy firmou AGOWA (BRD).

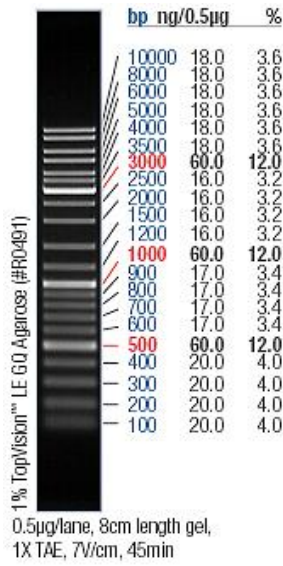
⁶ Tučně jsou označeny nukleotidy, které jsou komplementární s cílovou DNA.

3.1.7 Standardy velikostí a množství DNA fragmentů

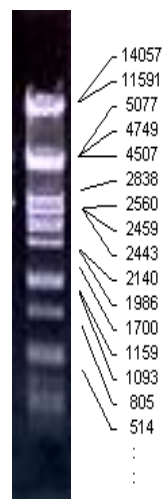
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder
(#SM0311, MBI Fermentas, Litva)



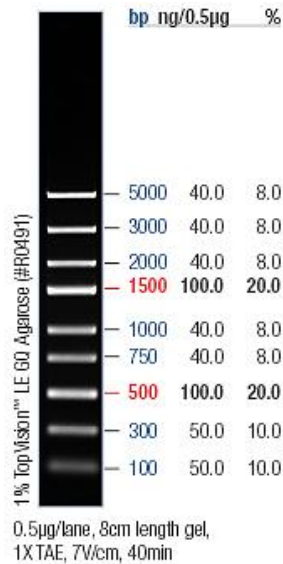
GeneRuler™ DNA Ladder Mix
(#SM0331, MBI Fermentas, Litva)



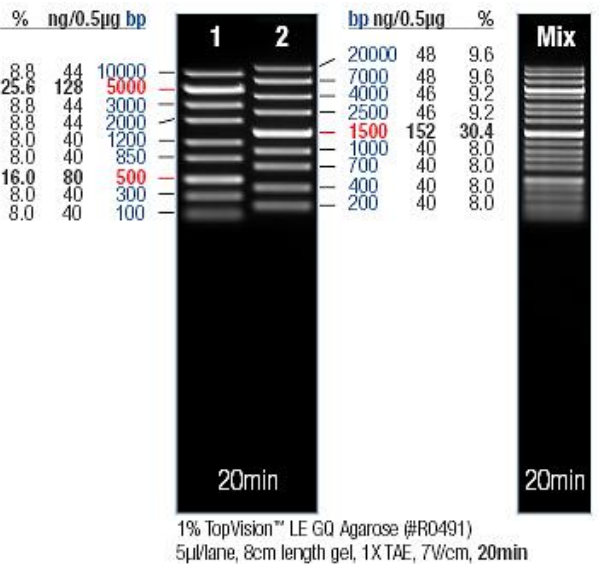
λ/PstI (0,5µg/10µl)



GeneRuler™ Express DNA Ladder
(#SM1553, MBI Fermentas, Litva)



ZipRuler™ Express DNA Ladder Set, 1 a 2
(#SM1378, MBI Fermentas, Litva)



3.1.8 Kultivační média a roztoky

A. Kultivace bakteriálních kmenů

Všechna média připravit z destilované vody a sterilizovat v autoklávu 20 min. při 121°C.

1× LB

10 g/l	Universalpepton M66 (MERCK, BRD)
5 g/l	Yeast Extract (Formedium LTD, UK)
5 g/l	NaCl (Penta, ČR)

2× LB (Super LB)

20 g/l	Universalpepton M66 (MERCK, BRD)
10 g/l	Yeast Extract (Formedium LTD, UK)
5 g/l	NaCl (Penta, ČR)
0,1 mg/ml	Thyamin (Sigma, USA)

ŽA

40 g/l	4% živný agar č. 2 (Imuna, SR)
--------	--------------------------------

V případě potřeby přidat do kultivačního média selekční antibiotikum:

Ampicilin: výsledná koncentrace 100 µg/ml (Biotika, SR)

= 1000× koncentrovaný zásobní roztok (100 mg/ml), přidat do vychladlých médií (cca 55°C)

B. Kultivace kvasinkových kmenů

Všechna média připravit z vody upravené v přístroji Watrex filtry Rovapur 100 a Ultrapur a sterilizovat v autoklávu 20 min. při 121°C. V případě přípravy pevného média přidat odpovídající množství agaru.

YPAD

20 g/l	Universalpepton M66 (MERCK, BRD)
10 g/l	Yeast Extract (Formedium LTD., UK)
100 mg/l	Adenin-hemisulfát (Sigma, USA)
15-18 g/l	Agar Bacteriological (Oxoid LTD., UK)

= rozpustit do 900 ml vody.

Autoklávovat a přidat 100 ml 20% glukózy (Sigma, USA) a ampicilin (výsledná koncentrace 100 µg/ml; Biotika, SR).

2× YPAD

40 g/l	Universalpepton M66 (MERCK, BRD)
20 g/l	Yeast Extract (Formedium LTD., UK)
100 mg/l	Adenin-hemisulfát (Sigma, USA)
15-18 g/l	Agar Bacteriological (Oxoid LTD., UK)

= rozpustit do 800 ml vody.

Autoklávovat a přidat 200 ml 20% glukózy (Sigma, USA) a ampicilin (výsledná koncentrace 100 µg/ml; Biotika, SR).

YPD

20 g/l	Universalpepton M66 (MERCK, BRD)
10 g/l	Yeast Extract (Formedium LTD., UK)
15-18 g/l	Agar Bacteriological (Oxoid LTD., UK)

= rozpustit do 800 ml vody.

Autoklávovat a přidat 200 ml 20% glukózy (Sigma, USA) a ampicilin (výsledná koncentrace 100 µg/ml; Biotika, SR).

SD médium

6,7 g/l	Yeast nitrogen base without amino acids (zdroj dusíku, vitamíny, základní a kovové ionty; Difco TM , USA)
1,394 g/l	Synthetic complete (SC-HIS, -LEU, -TRP, -URA) (směs aminokyselin a bází vyjma uvedených; Formedium LTD., UK)
15-18 g/l	Agar Bacteriological (Oxoid LTD., UK)

= rozpustit do 900 ml vody.

Autoklávovat a přidat dle požadované selekce 10 ml roztoku aminokyselin a bází (viz. níže), 100 ml 20% glukózy (Sigma, USA) a ampicilin (výsledná koncentrace 100 µg/ml; Biotika, SR).

SD médium s 5-FOA

= *stejné složení jako SD médium.*

1 g/l 5-FOA (Sigma, USA)

- Rozpustit 1 g 5-fluoroorotové kyseliny (5-FOA) do 500 ml vody. Při rozpouštění zahřívát max. na 65°C, sterilizovat filtrací.
- Připravit 500 ml SD média (množství vložených složek SD média vypočteno na konečný objem 1 l; 2× koncentrovaný základ), po autovyklávování přidat dle požadované selekce 10 ml roztoku aminokyselin a bází (viz. níže), 100 ml 20% glukózy (Sigma, USA) a ampicilin (výsledná koncentrace 100 µg/ml; Biotika, SR).
- Ponechat vychladit 2× koncentrovaný základ SD média s přidanou glukózou a aminokyselinami pod 65°C a poté smíchat s roztokem obsahujícím 5-FOA.

Presporulační agar

20 g/l	Universalpepton M66 (MERCK, BRD)
10 g/l	Yeast Extract (Formedium LTD., UK)
20g/l	Agar Bacteriological (Oxoid LTD., UK)

= rozpustit do 500 ml vody.

Autoklávovat a poté přidat 500 ml 20% glukózy (výsledná koncentrace 10%; Sigma, USA) a ampicilin (výsledná koncentrace 100 µg/ml; Biotika, SR).

Fowelův (sporulační) agar

5 g/l	KAc (Sigma, USA)
2,3 g/l	KCl (Lachema-Brno, Chemapol; ČR)
20g/l	Agar Bacteriological (Oxoid LTD., UK)

= rozpustit do 970 ml vody.

Po autovyklávování přidat ampicilin (výsledná koncentrace 100 µg/ml; Biotika, SR) a nezbytné aminokyseliny (viz. níže) dle potřeb daného kmene.

Ringerův roztok

7,5 g/l	NaCl (Penta, ČR)
0,075 g/l	KCl (Lachema-Brno, Chemapol, ČR)
0,1 g/l	NaHCO ₃ (Lachema-Brno, Chemapol, ČR)
0,1 g/l	CaCl ₂ (Sigma, USA)

Roztoky aminokyselin a uracilu (100× koncentrované zásobní roztoky)

L-histidin HCl monohydrát (Sigma, USA)	2 g/l
L-leucin (Sigma, USA)	10 g/l
L-tryptofan (Sigma, USA)	2 g/l
L-uracil (Sigma, USA)	2 g/l

V případě potřeby přidat do kultivačního média selekční antibiotikum:

Geneticin (G418): výsledná koncentrace 200 µg/ml (Amersham, USA)

= 100× koncentrovaný zásobní roztok (20 mg/ml), přidat do vychladlých médií
YPAD

3.2 Metody

3.2.1 Metody kultivace organismů

Růst na pevných médiích

- Petriho misky (průměr 60 mm nebo 90 mm) s médiem vhodným pro organismus (viz. kap. 3.1.8., Kultivační média a roztoky) zaočkovat pomocí mikrobiologické kličky nebo sterilního párátka.
- Růst organismů probíhá v termostatu 1 den v případě *E. coli* či 3-4 dny u *S. cerevisiae*. Běžná kultivační teplota je pro *E. coli* 37°C a *S. cerevisiae* 30°C.
- Skladovat max. tři týdny v lednici při 10°C, potom kulturu přenést na nové plotny. Jeden klon buněk lze pasážovat maximálně dva měsíce, pak je potřeba rozmrazit nový klon z glycerolové konzervy uložené v mrazáku při teplotě -80°C.

Kultivace v třepaných médiích

- Sterilní 50-250 ml Erlenmayerovu baňku naplnit kultivačním médiem o objemu maximálně 1/10 celkového objemu baňky. Zaočkovat příslušnými mikroorganismy a aerobně kultivovat na třepačce při otáčkách 180-200 rpm. Inkubovat při teplotě dle vybraného organismu a zvoleného pokusu po patřičně dlouhou dobu.
- Nárůst kultury sledovat na spektrometru (Specol 20, SRN), jako blank se používá sterilní médium. Při optické densitě větší než 0,2 je nutno vzorek ředit, protože odečet by byl zatížen chybou.

Glycerolové konzervy *S. cerevisiae*

Příprava a výsev

- Jako výchozí materiál lze použít jakoukoliv suspenzi buněk *S. cerevisiae*, včetně suspenze enzymaticky opracovaných kvasinkových spor.
- K suspenzi kvasinek v deionizované vodě nebo vybraném typu média přidat 60% sterilní glycerol v poměru 1:1. Důkladně (ale šetrně) promíchat v ruce.
- Za občasného promíchání překlápěním inkubovat 20 min. na ledu, poté přenést do mrazáku (-80°C) a zde uchovávat.

- Při výsevu z glycerolových konzerv seškrábnout mikrobiologickou kličkou nebo sterilním párátkem vrchní vrstvu zmrzlých buněk a nanést na Petriho misku s vybraným typem média. Vše provádět velice rychle, aby konzervy nerozmrzly.

Roztoky:

60% glycerol 60% (v/v) glycerol (Sigma, USA)

Metody manipulace s DNA

3.2.2 Štěpení DNA restrikčními endonukleázami

- V 0,5 ml mikrozkušavce připravit následující restrikční směs:
 2 μ l 10 \times restrikčního pufru (1/10 výsledného objemu)
 [2 μ l BSA (100 μ g/ μ l, 1/10 výsledného objemu)]
 x μ l DNA v deionizované vodě (0,1-4 μ g DNA)
 = doplnit deionizovanou vodou do objemu 20 μ l
- V závislosti na struktuře a čistotě vzorku přidat 1-10 U enzymu/ μ g DNA. Inkubovat 1-4 hod. při optimální teplotě štěpení, poté reakci zastavit přidáním vzorkového pufru nebo ochlazením směsi na -20 °C, příp. zahřátím 20 min. při 65°C.
- Množství a kvalitu naštěpené DNA ověřit elektroforeticky v agarózovém gelu.

3.2.3 Amplifikace DNA pomocí PCR

Přípravu směsi před vložením do PCR cyklieru je vhodné provádět na ledu. Celkový objem vzorků 10-100 μ l.

- V 0,2 ml mikrozkušavce připravit směs v následujícím pořadí (výsledný objem 15 μ l⁷):
 1) 7,5 μ l deionizované vody se vzorkem DNA
 0,1-7,5 μ l templátové DNA (10 pg-1 μ g ve výsledném objemu; 0,1-1 μ g genomové DNA *S. cerevisiae* na 50 μ l reakční směsi)
 = dle potřeby doplnit deionizovanou vodou do objemu 7,5 μ l a následně přidat 7,5 μ l reakční směsi pro PCR (viz. níže).

⁷ Výsledný reakční objem lze lineárně zvyšovat. Koncentraci MgCl₂ je možno upravovat dle konkrétní aplikace (1,5-2,5 mM).

poznámka: V případě detekce DNA z buněčné kolonie nabrat pomocí bílé špičky malou část biomasy a resuspendovat ji do 7,5 µl deionizované vody, buňky vystavit teplotě 95°C po dobu 3 min. (uvolnění DNA z buněk), poté přenést na led a přidat reakční směs pro PCR.

2) 7,5 µl reakční směsi:

- 1,5 µl reakčního pufru bez MgCl₂ (1/10 výsledného objemu)
- 1,5 µl primeru 1 (1/10 výsledného objemu; zásobní konc. 10 µM)
- 1,5 µl primeru 2 (1/10 výsledného objemu; zásobní konc. 10 µM)
- 0,9-1,5 µl MgCl₂ (1/10 výsledného objemu; zásobní konc. 25 mM)
 - čistá templátová DNA: 1,5 mM
 - DNA detekovaná z povražených buněk: 2,5 mM
- 1,5 µl dNTP (1/10 výsledného objemu; zásobní konc. 4× 2,5 mM)

- Přidat příslušnou DNA polymerázu v množství doporučeném výrobcem.
- Ke každé sadě reakcí namíchat vždy nejméně jednu negativní kontrolu bez templátu pro odhalení případných kontaminací a je-li možné i jednu pozitivní kontrolu pro ověření specifity reakce.
- Mikrozkumavku se směsí pro PCR inkubovat v PCR cykleru (Peltier PTC-200; MJ Research, USA) dle příslušného programu.
- Produkty PCR analyzovat elektroforeticky.

3.2.4 Ligace DNA v roztoku

- V 0,5 ml mikrozkumavce namíchat reakční směs:
 - 1 µl 10× ligačního pufru (1/10 výsledného objemu)
 - DNA vektor a inzert v molárním poměru 1:3-4 (0,1-10 mM)
 - přidat příslušnou DNA ligázu v množství doporučeném výrobcem= doplnit deionizovanou vodou do konečného objemu 10 µl
- Ligační směs inkubovat 2–4 hod. při laboratorní teplotě. Pro zvýšení účinnosti reakce lze přenést ligační směs do vodní lázně o pokojové teplotě, přemístit do lednice a ponechat ligovat přes noc.
- Ligázu inaktivovat zahřátím na 65°C po dobu 15 min. 1-5 µl ligační směsi transformovat do *E. coli*.

3.2.5 Elektroforetická analýza DNA v agarózovém gelu

- Elektroforézu DNA vzorků provádět v přístroji pro horizontální gelovou elektroforézu v pufru 1× TAE. Používat délku gelů 6-10 cm, tloušťku 3-5 mm, vzdálenost elektrod 14 cm.
- Agarózu SeaPlaque LE používat pro eluční, agarózy SeaKem a Nu-Sieve též pro analytické účely (vše FMC, USA). Koncentrace agarózových gelů 0,8-2,5% v závislosti na velikosti DNA fragmentů.
- Do jamek o rozměrech 4-15× 1 mm nanášet 5–50 µl vzorku (10 ng–2 µg DNA) s 1/5 (pro eluci 1/10) objemu vzorkového pufru, dále pak 3-10 µl vzorku standartu velikostí fragmentů.
- Používat dělicí napětí v rozmezí 0,3-10 V/cm. Gel barvit v roztoku ethidium bromidu (0,5 µg/ml) po dobu 5-10 min. Gely fotografovat v procházejícím UV záření s červeným/UV-filtrem. Snímky exponovat 2,5-4 sec. (digitální fotoaparát Panasonic DMC-F27).

Roztoky:

1× TAE 40 mM Tris, 20mM ledová kyselina octová, 2 mM Na₂EDTA,
pH 8,5

6× vzorkový pufr 0,06% bromfenolová modř, 60% glycerol, 60 mM EDTA

3.2.6 Izolace fragmentů DNA z gelu pomocí NucleoSpin® Extract II (Macherey – Nagel, SRN)

- Čistým skalpelem vyříznout oblast gelu s požadovaným fragmentem DNA. Přenést jej do mikrozkušavky a zvážit.
- Na každých 100 mg agarózy přidat 200 µl roztoku NT.
(V případě vyšší hustoty agarózy než 2% přidat dvojnásobný objem NT roztoku)
- Inkubovat vzorek při 50°C dokud se agaróza nerozpustí (5–10 min.). Vzorek krátce vortexovat každé 2-3 min.
- NucleoSpin Extract II kolonku umístit do sběrné 2 ml mikrozkušavky, nanést vzorek a centrifugovat (Hettich MIKRO 20; 13 000 rpm, 1 min., 20°C), odstranit roztok ze sběrné 2 ml mikrozkušavky.
- Přidat 600 µl roztoku NT3 a opět centrifugovat (Hettich MIKRO 20; 13 000 rpm, 1 min., 20°C).

- Po odstranění roztoku ze sběrné 2 ml mikrozkušavky zopakovat centrifugaci pro zbavení se zbytku ethanolu obsaženého v roztoku NT3 (Hettich MIKRO 20; 13 000 rpm, 2 min., 20°C).
- Kolonku umístit do čisté 1,5 ml mikrozkušavky, nanést 25–50 µl elučního pufru nebo deionizované vody, nechat stát 1 min. při pokojové teplotě a poté centrifugovat (Hettich MIKRO 20; 13 000 rpm, 1 min., 20°C).

poznámka: V případě přečištění fragmentů o velikosti větší než-li 5 kb je vhodné pro větší výtěžek použít eluční pufu přehřátý na teplotu 70°C.

3.2.7 Zaklonování produktů PCR pomocí TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, USA)

- V 0,5 ml mikrozkušavce namíchat následující směs:

0,5-4 µl produktu PCR

1 µl 4× koncentrovaného roztoku solí

1 µl vektoru pCR 2.1 TOPO

= doplnit do 6 µl deionizovanou vodou

- Jemně promíchat a inkubovat 30 sec. až 30 min. při pokojové teplotě. Poté reakci zastavit přenesením na led.
- 2 µl z reakce ihned transformovat chemickou cestou do kompetentních buněk *E. coli* kmen TOP10:
 - DNA přidat k buňkám a suspenzi mírně promíchat.
 - Buňky inkubovat 5-30 min. na ledu.
 - Provést tepelný šok umístěním buněk na 30 sec. do 42°C a ihned poté je přemístit zpět na led.
 - Přidat 250 µl SOC média a inkubovat buněčnou suspenzi 1 hod. při 37°C (doba potřebná k expresi genů pro rezistenci k antibiotikům).
- Vysít 10-50 µl suspenze buněk na ŽA plotny s ampicilinem (100 µg/ml; Biotika, SR) a substrátem X-Gal (výsledná koncentrace 40 mg/ml; Promega, USA). Je vhodné vysévat dva různé objemy suspenze pro zajištění přiměřené hustoty kolonií.

- Z narostlých kolonií vybrat bílé nebo světle modré (sytě modré obsahují pouze prázdný vektor bez insertu), izolovat z nich plazmidy a ověřit jejich identitu restrikční analýzou nebo pomocí PCR.

3.2.8 Izolace plazmidové DNA alkalickou metodou z *E. coli*

Birboim, 1983; upraveno pro semipreparativní izolaci plazmidové DNA z 10–50 ml bakteriální kultury

1. den (odpoledne)

- Na plotnu s vybraným typem media obsahujícím selekční antibiotikum (ampicilin, 100 µg/ml; Biotika, SR) zaočkovat bakteriální klon *E. coli* nesoucí příslušný plazmid. Kultivovat přes noc při 37 °C.

2. den (odpoledne)

- Jednou dobře oddělenou kolonií zaočkovat 10-50 ml živného média se 100 µg/ml ampicilinu (Biotika, SR) v 50-250 ml Erlenmayerově baňce.
- Baňku umístit do třepačky (180 rpm) a kultivovat při 37 °C přes noc (po dobu min. 16 hod.).

3. den (ráno)

- Kulturu ochladit v ledové lázni (cca 10 min.), přelít do centrifugační zkumavky (50 ml Falcon) a centrifugovat (Jouan MR 22i, rotor SWM 180.5; 4 000 rpm, 20 min., 0°C).
- Sediment dokonale resuspendovat do **1x⁸** ml **roztoku I.**, ponechat 15 min. inkubovat na ledu.
- Zkumavku vyjmout z ledové lázně, přidat **2x¹** ml **roztoku II.** a promíchat (buňky lyzují, suspenze se projasní, výrazně stoupne viskozita). Inkubovat po dobu 1-10 min.
- Zkumavku opět přenést do ledové lázně a přidat **1,5x¹** ml **roztoku III.**, lehce promíchat a inkubovat 30-60 min. na ledu (z roztoku vypadne bílá sraženina).
- Směs převést do zkumavek pro rotor na centrifugu Jouan MR22i a sraženinu usadit centrifugací (Jouan MR22i, rotor AM 38.15; 15 000 rpm, 20 min., 4°C).

⁸ Množství přidávaných roztoků zvolit podle výchozího objemu a nárůstu kultury. Hodnota x obvykle odpovídá 0.5-1.0 ml při 10 ml kultury a 2-4 ml při 50 ml.

- Supernatant převést do polypropylenové centrifugační zkumavky, zjistit objem a dokonale smísit s 0.6 objemu isopropanolu, ihned centrifugovat (Jouan MR 22i, rotor SWM 180.5; 4 000 rpm., 6 min., 20°C).
- Supernatant slít a kapky na okraji odsát buničitou vatou. Sediment krátce osušit, poté rozpustit v 300 µl deionizované vody a převést do mikrozukavky.
- Odměřit objem a dokonale smísit se stejným objemem 10 M LiCl a inkubovat při -20 °C 60 min. (popř. při -80 °C, 20 min.).
- Vzniklou sraženinu usadit centrifugací (Hettich MIKRO 20; 13 000 rpm, 5 min., 20°C), supernatant převést do nové mikrozukavky.
- Odměřit objem a plazmidovou DNA vysrážet z roztoku jedním objemem 96% ethanolu při teplotě -20 °C nejméně 60 min. (popř. -80°C, 20 min.).
- Sraženinu DNA usadit centrifugací (Hettich MIKRO 20; 13 000 rpm, 5 min., 20°C), supernatant slít a sediment 2-3x opláchnout 1 ml 70% EtOH (event. utržený sediment usadit centrifugací) a ponechat vysušit na stole či v termostatu při 37 °C.
- Podle množství sedimentu rozpustit ve 100-200 µl deionizované vody nebo TE pufru (pH 8.0). Množství a kvalitu izolace plazmidové DNA zjistit elektroforeticky.

Roztoky:

roztok I (TEG) 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA-NaOH, 1% glukóza

roztok II 1% SDS, 0.2N NaOH

roztok III 3M octan draselný (KAc), 2M kys. octová, pH 5,4

3.2.9 Izolace plazmidové DNA z *E. coli* pomocí NucleoSpin®

Plasmid (Macherey – Nagel, SRN)

1. den (odpoledne)

- Jednou dobře oddělenou kolonií *E. coli* nesoucí příslušný plazmid zaočkovat max. 5 ml živného média s 100 µg/ml (Biotika, SR) u v 50 ml Erlenmayerově baňce.
- Baňku umístit do třepačky (180 rpm) a kultivovat při 37 °C přes noc (tzn. asi 16-18 hod.).

2. den (ráno)

- Narostlou kulturu převést do centrifugační zkumavky (15 ml Falcon) a centrifugovat (Jouan MR22i, rotor SWM 180.5; 4 000 rpm, 2 min., 4°C). Odstranit supernatant.
- Pelet resuspendovat v 250 µl roztoku A1 a převést do 2 ml mikrozukavky. Přidat 250 µl roztoku A2. Jemně promíchat otáčením mikrozukavky a inkubovat při pokojové teplotě max. 5 min.
- Přidat 250 µl roztoku A3. Jemně promíchat, centrifugovat (Hettich MIKRO 20; 13 000 rpm, 10 min., 20°C).
- Kolonku NucleoSpin Plasmid umístit do 2 ml sběrné mikrozukavky, převést supernatant z předchozího kroku na kolonku a centrifugovat (Hettich MIKRO 20; 13 000 rpm, 1 min., 20°C). Z 2 ml mikrozukavky odstranit tekutinu, která prošla přes kolonku.
- Pro zbavení se buněčných nukleáz je doporučeno nanést na kolonku 500 µl roztoku AW předehřátého na 50°C a opakovat centrifugaci (Hettich MIKRO 20; 13 000 rpm, 1 min., 20°C).
- Na kolonku nanést 600 µl roztoku A4 a opět centrifugovat (Hettich MIKRO 20; 13 000 rpm, 1 min., 20°C).
- Po odstranění roztoku ze sběrné 2 ml mikrozukavky zopakovat centrifugaci (Hettich MIKRO 20; 13 000 rpm, 2 min.). Zbytek ethanolu, který je obsažen v roztoku A4, by mohl snížit účinnost následné eluce.
- Kolonku umístit do čisté 1,5 ml mikrozukavky, přidat 30 µl roztoku AE, inkubovat 1 min. při pokojové teplotě a poté centrifugovat (Hettich MIKRO 20; 13 000 rpm, 1 min., 20°C). Eluci lze rovněž provést pomocí TE pufru nebo deionizované vody.

poznámka: Stejnou soupravu lze použít i pro čištění plazmidové DNA např. pro sekvenování. V tomto případě se doplní roztok plazmidu roztokem A1 na výsledný objem 250 µl, ihned se přidají roztoky A2 a A3 a provede se první centrifugace. Dále se pokračuje dle návodu (viz. výše).

3.2.10 Izolace plazmidové DNA z *S. cerevisiae* pomocí skleněných kuliček

1.den (odpoledne)

- Jednou oddělenou kolonií *S. cerevisiae* zaočkovat 5 ml příslušného selekčního SD média a inkubovat na třepačce nejméně 20 hod. (při 30°C, 180-220 rpm).

2. den (ráno)

- Narostlou kulturu převést do centrifugační zkumavky (15 ml Falcon) a buňky usadit centrifugací (Jouan MR 22i, rotor SWM 180.5, 3 000 rpm, 5 min., 20°C). Supernatant slít, sediment resuspendovat ve zbytkové tekutině a převést do 1,5 ml mikrozukmavky.
- Přidat 200 µl roztoku yeast lysis solution, poté 200 µl směsi pufrovaného fenolu : chloroformu : isoamylalkoholu v poměru 25:24:1 a 0,3 g předem omytých skleněných kuliček⁹ (425-600 µm; Sigma, USA).
- Intenzivně vortexovat min. 2 min. Poté centrifugovat (Hettich MIKRO 20; 13 000 rpm, 5 min., 20°C).
- Svrchní vodnou fázi převést do nové 1,5 ml mikrozukmavky. Přidat 0,1 objemu 3M NaAc (pH 5,2) a DNA vysrážet 2,5 objemy 96% ethanolu (min. 60 min., při teplotě -20°C).
- Centrifugovat (Hettich MIKRO 20; 13 000 rpm, 5 min., 20°C), poté slít supernatant a sediment omýt v 70% ethanolu. Opětovně centrifugovat a sraženinu ponechat lehce vysušit a pak rozpustit ve 20–50 µl deionizované vody nebo TE pufru.
- Množství plazmidové DNA a kvalitu izolace ověřit elektroforeticky.
- Izolovanou DNA transformovat do *E. coli* elektroporací, v případě neúspěchu purifikovat a transformaci zopakovat.

Roztoky:

yeast lysis solution 2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris
(pH 8.0), 1 mM EDTA

⁹ Kuličky ponechat přes noc v 0.1M HCl, potom promýt deionizovanou vodou do neutrální reakce a osušit.

poznámka: Kvalita vyizolované plazmidové DNA je dostačující pro následnou transformaci *E.coli* nebo PCR, není však vhodná pro přímou restriční analýzu.

3.2.11 Izolace chromozomální DNA z *S. cerevisiae*

1.den (odpoledne)

- Jednou nebo několika oddělenými koloniemi *S. cerevisiae* (Ø kolonie 2–3 mm) zaočkovat 15 ml YPAD nebo příslušného selekčního média SD.
- Kultivovat na třepačce (180-220 rpm) při 30°C po dobu 16-18 hod. do pozdní stacionární fáze (OD₆₀₀= 2-3).

2. den (ráno)

- Narostlou kulturu převést do 15 ml centrifugační zkumavky (15 ml Falcon) a buňky usadit centrifugací (Jouan MR 22i, rotor SWM 180.5; 3 000 rpm, 5 min., 20°C).
- Sediment resuspendovat do 1 ml **roztoku I**, převést do 2 ml mikrozukavky a inkubovat 20 min. při laboratorní teplotě, poté centrifugovat (Hettich MIKRO 20; 3 000 rpm, 5 min., 20°C).
- Sediment resuspendovat do 1 ml **roztoku II**, inkubovat při 37°C 30–60 min., kvalitu natrávení lze po 30 min. zkontrolovat na mikroskopu.

poznámka: Při fázovém kontrastu po přidání 1 µl 10% SDS buňky ztratí svoji typickou refringenci-světelný lom po obvodu, jeví se černě; s destilovanou vodou buňky popraskají.

- Buněčnou suspenzi centrifugovat (Hettich MIKRO 20; 3 000 rpm, 5 min., 20°C) a odsát veškerou kapalinu.
- Sediment resuspendovat v 900 µl **roztoku III** a pak přidat 6 µl proteinasy K (Roche-Boehringer Mannheim, BRD; zásobní roztok 10 mg/ml), dobře promíchat. Přidat 100 µl 10% SDS, opět dobře promíchat a inkubovat při 55°C přes noc.
- Extrahovat pomocí 1 ml pufrovaného fenolu (pH 7,9), jemně promíchávat min. 20 min. a poté centrifugovat (Hettich MIKRO 20; 13 000 rpm, 15 min., 20°C).
- Horní vodnou fázi převést do nové 2 ml mikrozukavky a extrahovat 1 ml směsi pufrovaného fenolu (pH 7,9)/chloroformu/isoamylalkoholu 25:24:1, jemně

promíchávat 20 či více min., centrifugovat (Hettich MIKRO 20; 13 000 rpm, 15 min., 20°C).

- Horní vodnou fázi převést do nové 2 ml mikrozkušavky, extrahovat 1 ml směsi chloroformu/isoamylalkoholu 24:1, jemně promíchávat 20 či více min., centrifugovat (Hettich MIKRO 20; 13 000 rpm, 15 min., 20°C).
- Horní vodnou fázi převést do nové 2 ml mikrozkušavky, DNA vysrážet 0,1 objemem 3M octanu sodného (pH=5,2) a 2,5 objemem 96% ethanolu, promíchat a inkubovat 1 hod. při -20°C.
- DNA precipitovat centrifugací (Hettich MIKRO 20; 13 000 rpm, 10-30 min., 20°C).
- Pelet opláchnout chladným 70% ethanolem, centrifugovat (Jouan MR 22i; 13000 rpm, 1 min., 20 °C) a zbylou tekutinu odsát. Vysušit zbylý ethanol. Pelet resuspendovat v 200 µl TE.
- K DNA rozpuštěné v 200 µl TE pufru přidat 2 µl RNázy (zásobní koncentrace 10 mg/ml) a ponechat trávit 1 hod. v 37°C. Poté přidat 4 µl proteinasy K (Boehringer Mannheim, zásobní roztok 10 mg/ml), dobře promíchat a přidat 20 µl 10% SDS, opět dobře promíchat a inkubovat při 55°C 1 hod.
- Doplnit 300 µl TE pufru na konečný objem 500 µl.
- Zopakovat postup od kroku extrakce jedním objemem směsi pufrovaného fenolu (pH 7,9)/chloroformu/isoamylalkoholu 25:24:1, tento krok provést dvakrát a následně postupovat dál dle návodu (viz výše).
- Podle množství sedimentu rozpustit v 100-200 µl TE pufru (pH 7,5).

Roztoky:

roztok I 50mM EDTA (pH 8,0) 1% β-ME

roztok II 1,2 M sorbitol, 100 mM EDTA (pH 8,0), 0,1% β-merkaptoethanol
+ Yeast lytic enzyme (výsledná koncentrace 2 mg/ml; rozpustit
do vody a přidat do roztoku II před přidáním sorbitolu)

roztok III (5x TE) 50 mM Tris-HCl pH7.5, 50 mM EDTA

3.2.12 Transformace *E. coli* elektroporací

Příprava kompetentních buněk

1.den (odpoledne)

- Jednou dobře oddělenou kolonií příslušného kmene *E. coli* zaočkovat 10 ml Super LB média v 100 ml Erlenmayerově baňce a kultivovat přes noc na třepačce (180 rpm) při 37°C.

2. den (ráno)

- Kulturu zaočkovat 400 ml média Super LB na $OD_{600} = 0,05$ (2× 200 ml média ve dvou 2 l Erlenmayerových baňkách).
- Kulturu inkubovat na třepačce (180 rpm, 37°C) dokud nedosáhne $OD_{600} = 0,6$.
- Baňky přenést do ledové lázně a kulturu zde ochladit po dobu 10-15 min. (všechny další kroky rovněž provádět na ledu).
- Kulturu přelít do dvou 250 ml plastových centrifugačních zkumavek (Nalgene, USA) a buňky usadit centrifugací (Janetzki K26; 3 500 rpm, 10 min., 4°C).
- Supernatant opatrně slít, sediment nejprve pipetou sterilně resuspendovat v 10 ml ledové deionizované vody, poté vodou doplnit na původní objem.
- Opětovně centrifugovat, resuspendovat a doplnit vychlazenou vodou na objem 100 ml.
- Buněčné suspenze převést do čtyř 50 ml centrifugačních zkumavek (50 ml Falcon), znovu centrifugovat (Jouan MR 22i, rotor SWM 180.5; 4 000 rpm, 20 min., 4°C).
- Sedimenty resuspendovat pipetou v malém množství 10% (w/w) ledového glycerolu (1-5 ml) a poté glycerolem doplnit na 25 ml. Suspenze spojit do dvou centrifugačních zkumavek a centrifugovat (Jouan MR 22i, rotor SWM 180.5; 4 000 rpm, 20 min., 4°C). Promytí glycerolem je možné ještě jednou zopakovat.
- Promyté sedimenty resuspendovat ve stejném objemu 10% glycerolu (včetně zbytkového objemu supernatantu), suspenzi rozdělit po 100-200 µl do 1,5 ml mikrozkušavek předem vychlazených v tekutém dusíku.
- Mikrozkušavky ihned zamrazit v tekutém dusíku, dlouhodobě skladovat při teplotě -80°C v mrazáku.

Vlastní transformace plazmidové DNA

- Do 0,5 ml mikrozkušavky s 0,5–5 μ l roztoku plazmidové DNA v deionizované vodě/TE pufru nebo s ligační směsí (obsahujícím 5 pg-0.5 μ g DNA) přidat na ledu 30-50 μ l elektrokompetentních buněk.
- Obsah mikrozkušavky převést na dno vychlazené 0,2 cm elektroporační kyvety (Biorad, USA), na generátoru pulzu přístroje Gene Pulser Apparatus (Biorad, USA) nastavit hodnoty kapacitance 25 μ F, napětí 2,5 kV a odpor 200 Ω a po vložení kyvety do přístroje aplikovat puls. Výsledná časová konstanta by měla být v rozmezí 4-5 milisek.
- Obsah kyvety okamžitě resuspendovat do 1 ml LB média s 0,5% glukózou, převést do skleněné zkumavky a kulturu inkubovat 60 min. na třepačce (37°C, 180 rpm).
- Na plotny s požadovaným typem média obsahujícím příslušné selekční antibiotikum (ampicilin; 100 μ g/ml; Biotika, SR) vysít 20 a 200 μ l kultury, plotny inkubovat v termostatu při 37°C přes noc.

Speciální kultivační metody pro *Saccharomyces cerevisiae*

3.2.13 Transformace *S. cerevisiae* lithium-acetátovou metodou

Podle Schiestl a Gietz, 1989; v úpravě Dr. Z. Palkové

Příprava kompetentních buněk

1.den (odpoledne)

- Jednou nebo několika oddělenými koloniemi *S. cerevisiae* (\varnothing kolonie 2–3 mm) zaočkovat 10 ml YPAD nebo příslušného selekčního média SD.
- Kultivovat na třepačce (180-220 rpm) při 30°C po dobu 16-18 hod. do stacionární fáze ($OD_{600} > 1,5$).

2. den (ráno)

- Kulturou zaočkovat **5x** ml **média**¹⁰ YPAD nebo příslušného selekčního média SD předem předeřátého a aerovaného na $OD_{600} = 0,1$ ($2-5 \times 10^6$ buněk/ml). Inkubovat

¹⁰ x označuje počet transformací jednotlivými plazmidy

na třepačce (30°C, 180-220 rpm) po dobu dvou generací (cca 3-5 hod) na výslednou $OD_{600} = 0,4-0,6$ ($1-2,5 \times 10^7$ buněk/ml).

- Narostlou kulturu centrifugovat v 50 ml centrifugační zkumavce (50 ml Falcon) (Jouan MR 22i, rotor SWM 180.5; 3 000 rpm, 3 min., 20°C).
- Sediment $2 \times$ promýt jedním objemem temperované deionizované vody, poté $1 \times$ promýt $1 \times$ ml roztoku¹ **H₂O/TE/LiAc**, po každém promytí opět centrifugovat (Jouan MR 22i, rotor SWM 180.5; 3 000 rpm, 3 min., 20°C).
- Výsledný sediment resuspendovat v **50x** μ l roztoku¹ **H₂O/TE/LiAc**, konečná koncentrace je přibližně mezi $1-2,5 \times 10^9$ buněk/ml (zahuštění 1:100) a inkubovat na třepačce (15 min. při 30°C, možno i déle).

Vlastní transformace

- do 1,5 ml mikrozkuvek pipetovat:
 - 50 μ l buněčné suspenze (cca 1×10^8 buněk)
 - 5 μ l ssDNA (salmon sperm DNA, 10mg/ml; Sigma, USA), čerstvě denaturovaná povařením a poté ochlazená na ledu
 - 1-5 μ l plazmidové DNA (>100 ng)
 - 300 μ l roztoku PEG/TE/LiAc
- Transformační směs důkladně vortexovat a inkubovat 30 min. při 30°C za občasného promíchání otáčením mikrozkuvky.
- Navodit tepelný šok přenesením do 42°C na 20 min., vzorek opět několikrát promíchat otáčením mikrozkuvky a krátce temperovat při laboratorní teplotě.
- Buněčnou suspenzi usadit centrifugací (Hettich MIKRO 20; 5 000 rpm, 3 min., 20°C) a pipetou odsát supernatant (roztok PEG), centrifugaci opakovat a odstranit zbylý PEG.
- Buňky $1 \times$ vyprat jedním objemem deionizované vody a usadit centrifugací (Hettich MIKRO 20; 5 000 rpm, 3 min., 20°C).
- Sediment resuspendovat v 100–200 μ l deionizované vody, 50 – 100 μ l suspenze vysévat na misky s příslušným selekčním SD médiem. Inkubovat v termostatu při 30°C 3-4 dny.

Roztoky:

50% PEG 5 g/10 ml (w/v) PEG 3350 (Sigma, USA), sterilizovat autoklárováním

10xTE 100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7,5, sterilizovat autoklárováním

1M LiAc 1,53 g/15 ml (Sigma, USA), pH upravit zředěnou kys. octovou na 7,5,
sterilizovat autoklávováním

PEG/TE/LiAc 8:1:1 tj. výsledné koncentrace 40% PEG/1× TE/100mM LiAc,
připravit čerstvě

H₂O/TE/LiAc 8:1:1 tj. výsledné koncentrace 100 mM LiAc/1× TE,
připravit čerstvě

3.2.14 Rychlá LiAc transformace *S. cerevisiae*

Podle Gietz, 2006; upraveno

1.den (odpoledne)

- Na plotnu s médiem 2× YPAD provést nátěr jedné nebo několika oddělených kolonií *S. cerevisiae* za pomoci mikrobiologické kličky nebo sterilního párátko.
- Kultivovat v termostatu při 30°C přes noc.

2. den (ráno)

- Z plotny seškrábnout asi 15-20 µl buněk a resuspendovat je v 25 µl deionizované vody v 1,5 ml mikrozkuhavce.
- K buňkám v 1,5 ml mikrozkuhavce přidat transformační směs:
 - 0,1–0,5 µg plazmidové DNA
 - 18 µl 1M LiAc (Sigma, USA)
 - 5 µl ssDNA (10 mg/ml; Sigma, USA), čerstvě denaturovaná povařením a poté ochlazená na ledudůkladně promíchat
- 120 µl 50% PEG (3350; Sigma, USA)
- Inkubovat při teplotě 42°C 40-60 min. Dobu lze prodloužit až na 3 hod. pro zvýšení účinnosti transformace.
- Centrifugovat (Hettich MIKRO 20; 13 000 rpm, 3 min., 20°C) a pipetou odstranit supernatant. Pelet důkladně resuspendovat v 500 µl deionizované vody.
- Vysévat 50 µl a 100 µl na příslušnou plotnu se selekčním SD médiem, inkubovat v termostatu při 30°C 3-4 dny.

Roztoky: viz. kap. 3.2.13

3.2.15 Křížení a sporulace *S. cerevisiae*, tetrádová analýza

Křížení, příprava diploidů

- Diploidní organismus *S. cerevisiae* připravit křížením kmenů opačného párovacího typu (*MATa* a *MATα*). Na pevné bohaté médium YPAD nakapat přes sebe suspenze kultur obou haploidních kmenů určených ke křížení (objem kapané suspenze buněk cca. 30-50 µl; inkubovat min. po dobu 4 hod. při teplotě 30°C). Poté převést kříženou biomasu na selekční médium, které umožňuje růst pouze diploidním jedincům.

Sporulace a tetrádová analýza

- Příslušný diploidní kmen *S. cerevisiae* hustě nanést na misku s presporulačním agarem a inkubovat do druhého dne v termostatu při 30°C.
- Narostlou biomasu přenést kvantitativně do 1,5 ml mikrozkušavky s Ringerovým roztokem nebo deionizovanou vodou tak, aby vznikla hustá, ale ještě pipetovatelná suspenze buněk. Vzniklou suspenzi nanést na misku se sporulačním agarem.
- Inkubovat 4-6 dní při pokojové teplotě. Průběžně mikroskopicky kontrolovat množství vzniklých tetrad. Je-li vrstva buněk vůči síle agaru příliš tenká, sporulace probíhá pomaleji.
- Malé množství dostatečně vysporulovaných buněk resuspendovat v 50 µl yeast lytic enzyme (1 mg/ml). Vřečka ponechat enzymaticky opracovat přibližně 5-10 min. při pokojové teplotě. Kvalitu natrávení kontrolovat mikroskopicky. Dostatečně natrávená vřečka naředit 1 ml deionizované vody.
- Na rovnou YPAD misku nanést cca 20 µl suspenze a rozetřít hokejkou podél průměru do centrální nebo okrajové části (podle použitého mikromanipulátoru). Po zaschnutí přebytečné vody oddělovat jednotlivé spóry z vřecek na mikromanipulátoru.

4. Výsledky

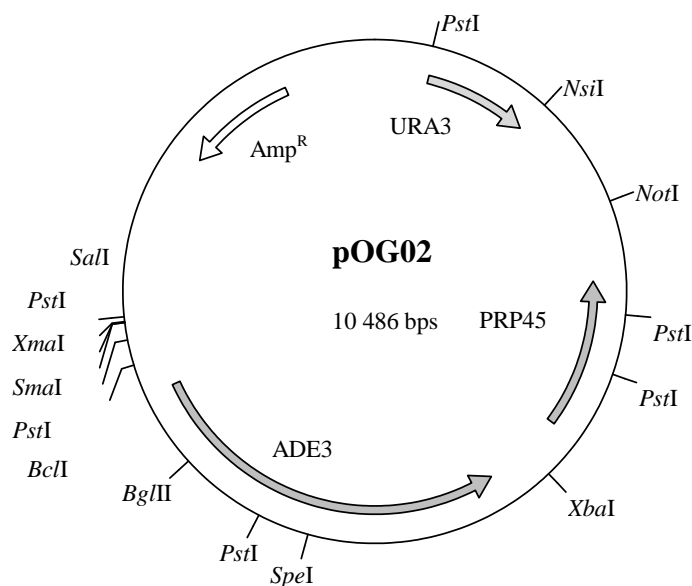
Tato práce navazuje na výsledky diplomové práce Mgr. Ondřeje Gahury (Syntheticky lethální interakce genu *PRP45* v *S. cerevisiae*, 2006), kterou úspěšně zahájil projekt zaměřený na hledání syntheticky lethálních interakčních partnerů mutace *prp45(1-169)*.

Při studiu synthetické lethality je třeba pracovat s kmenem, který obsahuje mutovanou alelu genu, k níž syntheticky lethální partnery hledáme. V naší laboratoři byla vytvořena genomová deleční verze genu *PRP45*, která kóduje zkrácený protein délky 169 aminokyselinových zbytků z původního počtu 379. Uvedená N-koncová varianta, označení *prp45(1-169)*, byla připravena Mgr. Kateřinou Abrhánovou (2002) a vykazuje citlivost ke zvýšené kultivační teplotě 37°C a drobný defekt buněčného dělení (viz. kap. 2.2, Literární úvod). Mutace *prp45(1-169)* vznikla vložením sekvence kódující HA-tag a selekční kazetu *kanMX6* prostřednictvím homologní rekombinace. Přítomnost selekční kazety lze detekovat rezistencí buněk k antibiotiku geneticinu (G418), na základě PCR s využitím primerů specifických pro oblast kazety nebo metodou Southern blot. Integraci lze také ověřit imunodetekcí pomocí protilátky namířené proti HA. Pro studium synthetické lethality byl připraven kmen FPY4B (Gahura *et al.*, přijato do tisku).

kmen **FPY4B**: *MATa prp45(1-169)-HA::kanMX6 ade2 ade3 his3 leu2 ura3*

Druhou součástí při studiu synthetické lethality založené na metodě Plasmid dependence assay (Basson *et al.*, 1987) je plazmid nesoucí funkční alelu genu, jehož syntheticky lethální partnery hledáme, v našem případě gen *PRP45*. Plazmid je centromerického typu s narušenou oblastí centromery, byl vytvořen Mgr. Ondřejem Gahurou a nese označení pOG02 (viz. obr. 4.1).

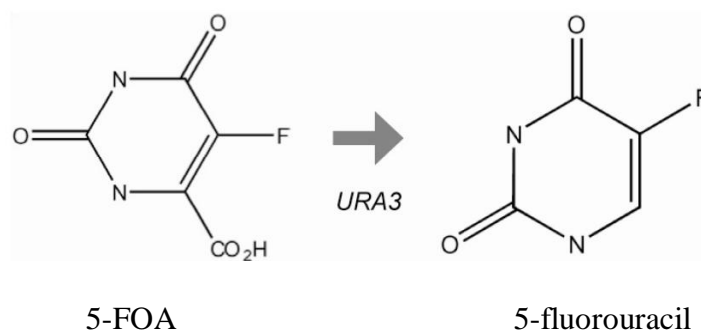
Dalším podstatným genem na plazmidu pOG02 je gen *ADE3*, který umožňuje snadnou vizualizaci ztráty pOG02 v buňkách genotypu *ade2/ade3* na základě tvorby bílých sektorů na jinak červených koloniích (viz. kap. 2.4.2, Literární úvod). Červené zabarvení lze pozorovat na médiích s omezeným množstvím adeninu (20% normálně dodávaného množství; Nigavekar a Cannon, 2002). Pro urychlení červenání je vhodné používat namísto běžné koncentrace 2% glukózy v médiu 4% (osobní sdělení Dr. Valášek).



Obr. 4.1. Schematické znázornění plazmidu pOG02.

Na obrázku jsou vyznačena některá významná restrikční místa a tři geny důležité pro studium syntetické lethality, *ADE3*, *URA3* a *PRP45*.

Plazmid pOG02 nese ještě gen *URA3*, který slouží k selekci transformovaných buněk. Přítomnost uvedeného genu lze s výhodou využít i k ověření závislosti buněk na plazmidu růstem na médiu, které obsahuje 5-fluoroorotovou kyselinu (5-FOA; Boeke *et al.*, 1987). Má-li buňka funkční gen *URA3* kódující OMP dekarboxylázu, dochází k přeměně orotidinmonofosfátu (OMP) na uridinmonofosfát (UMP). V přítomnosti 5-FOA však vzniká fluoroorotidinmonofosfát (FOMP), který je dekarboxylací (OMP dekarboxyláza) převeden na 5-fluorouridinmonofosfát (5-FUMP). 5-FUMP působí v buňce zejména jako inhibitor thymidylátsyntázy. Thymidylátsyntáza methyloje deoxyuridinmonofosfát (dUMP) na deoxythymidinmonofosfát (dTMP). Při reakci katalyzované thymidylátsyntázou v případě 5-FUMP chybí proton v poloze 5' (fluor vykazuje vysokou hodnotu elektronegativity) a proces je nevratně blokován. Jestliže se nesyntetizuje dTMP vyžadovaný pro replikaci DNA, dochází k blokaci buněčného cyklu v S fázi a k následné apoptóze.



Obr. 4.2. Schematické znázornění vzniku pyrimidinového analogu 5-fluorouracilu z prekursoru kyseliny 5-fluoroorotové (5-FOA) za katalýzy enzymu OMP dekarboxylázy (*URA3*).

Plazmidem pOG02 Mgr. Ondřej Gahura transformoval kmen FPY4B a poté UV mutagenézí vytvořil pět klonů, které vykazovaly stav syntetické lethality (označení FPY4B #1, #2, #3, #5 a #12). U dvou z připravených klonů (klony FPY4B #2 a #3) identifikoval prostřednictvím transformace genomovou knihovnou geny *SLU7* a *SYF3* zodpovědné za stav syntetické lethality. S využitím přímého testování, tzn. křížením dvou kmenů nesoucích konkrétní testované mutace, následnou sporulací diploidních buněk a analýzou vzniklých haploidních sporulantů, prokázal Mgr. Ondřej Gahura syntetickou lethality *prp45(1-169)* s mutacemi *prp22-1*, *cef-13* a *prp17-Δ*.

Cílem této diplomové práce bylo pokračovat v projektu hledání synteticky lethálních interakčních partnerů mutace *prp45(1-169)*. Pro usnadnění prohledávání jednotlivých klonů pomocí genomové knihovny bylo třeba připravit kmen opačného párovacího typu ke stávajícímu kmeni FPY4B. Oba kmeny byly poté podrobeny náhodné UV mutagenézi. Získané klony, jež vykazují stav syntetické lethality, byly rozděleny do tzv. komplementačních skupin. Po transformaci plazmidy, které nesou vybrané geny (potenciální genetické interakční partnery *PRP45*), a posléze i genomovou knihovnou bylo identifikováno několik genů, které obsahují mutace synteticky lethální s *prp45(1-169)*.

4.1 Příprava kmene opačného párovacího typu ke kmeni FPY4B

4.1.1 Křížení kmenů AVY02 a JB

Důležitými požadavky pro nový kmen v porovnání s kmenem FPY4B byla kromě již zmiňovaného opačného párovacího typu, tedy typu *MAT α* , tryptofanová auxotrofie. Neschopnost růstu na médiu bez tryptofanu je důležitá jak pro vlastní rozdělení mutantních klonů do komplementačních skupin (křížení), tak také pro možnost využití selekce buněk transformovaných plazmidy obsahujícími selekční gen *TRP1* (viz. dále).

Křížení kmenů AVY02 a JB předcházela nejprve snaha připravit požadovaný kmen křížením kmenů FPY4B a w303-1a. I přes opakování pokusu, kdy získaný diploid byl před sporulací transformován plazmidem s divokou alelou *PRP45*, neboť nebylo jisté, zda požadovaný genotyp není v rozporu s přítomností mutace *prp45(1-169)*, se nepodařilo nový kmen připravit (viz. tab. 8.1 a 8.2; Příloha).

Požadovaný genotyp pro nový kmen:

MAT α prp45(1-169)-HA::kanMX6 ade2 ade3 his3 leu2 trp1 ura3

Fenotyp:

- necitlivost vůči selekčnímu antibiotiku geneticinu (G418) a sensitivita růstu buněk ve zvýšené kultivační teplotě 37°C (přítomnost *prp45(1-169)-HA::kanMX6*)
- bílá barva kolonií (*ade3* genotyp)
- auxotrofie k aminokyselině tryptofan
- párovací typ *MAT α*

Vzhledem k popsaným obtížím byl zvolen odlišný postup. Z prvního křížení kmenů FPY4B a w303-1a byl vybrán klon nesoucí označení 1A, který byl pojmenován AVY02. Jako druhý vhodný rodič pro nové křížení byl zvolen kmen JB. Oba rodiče splňují požadavek na kmen opačného párovacího typu ke kmeni FPY4B, auxotrofii k aminokyselině tryptofan.

kmen **AVY02**: *MAT α prp45(1-169)-HA::kanMX6 ade2 his3 leu2 trp1 ura3*

kmen **JB**: *MAT α ade2 ade3 his3 leu2 trp1 ura3* + plazmid **pRS326** (*URA3, amp^R*, 2 μ)

Před křížením byl kmen JB transformován vektorem pRS326, transformované buňky posléze vykazují prototrofii k uracilu. Diploidní kmen byl získán křížením na bohatém médiu (médiu YPAD) a poté selekcí na rezistenci k antibiotiku geneticinu (G418, médium YPAD) a prototrofii k uracilu (minimální SD médium bez uracilu).

Ověření diploidů:

- rezistence k antibiotiku geneticinu, G418 (kmen AVY11 *prp45(1-169)::kanMX6*)
- prototrofie k uracilu (vektor pRS326 u kmene JB)

Po sporulaci a následné mikromanipulaci 12 spor bylo získáno 38 haploidních buněk. Mezi získanými klony byl požadovaný genotyp přítomen celkem devětkrát. Růstová citlivost buněk v teplotě 37°C byla potvrzena u čtyř klonů. Pro další práci byl vybrán klon 2C a označen AVY11 (viz. tab. 8.3, Příloha).

4.1.2 Testování kmene AVY11 na růst v restriktivní teplotě

Kmen AVY11 byl transformován plazmidy, které obsahují různé verze genu *PRP45* lišícími se velikostí a mírou exprese. Selektce buněk byla provedena na minimálních SD médiích dle příslušných selekčních markerů nesených na plazmidech. Gen *PRP45* umístěný na plazmidu pOG02 musí být schopný obnovit růst buněk s mutací *prp45(1-169)* při zvýšené kultivační teplotě 37°C.

Přehled použitých plazmidů:

plazmid **pOG02** (*PRP45*, *ADE3*, *URA3*, *amp^R*, *cenΔ*)

= plazmid používaný při studiu syntetické lethality, přítomna divoká alela genu *PRP45* pod vlastním promotorem i s přiléhající oblastí k 5' a 3' konci genu

plazmid **YEp13-PRP45** (*PRP45*, *LEU2*, *amp^R*, 2μ)

= vektor YEp13 nesoucí fragment genomové knihovny (Nasmyth a Tatchell, 1980) s nejbližším 5' a 3' okolím genu *PRP45*, vlastní promotor a regulační 5' a 3' přiléhající oblasti

plazmid **p416ADH-PRP45** (*PRP45*, *URA3*, *amp^R*, *cen*)

= divoká alela genu *PRP45* pod ADH promotorem a s CYC1 terminátorem

plazmid **p416ADH FUN20-ΔC5** (*prp45(1-168)*, *URA3*, *amp^R*, *cen*)

= zkrácená varianta genu *prp45(1-168)* pod ADH promotorem a CYC1 terminátorem.

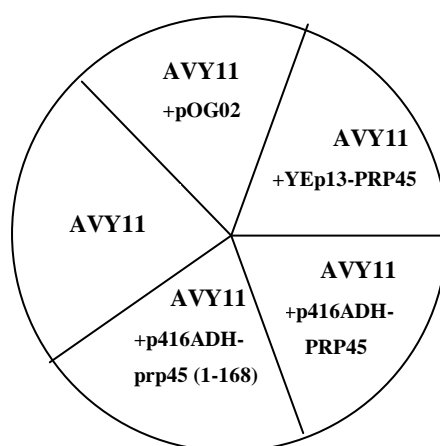
Pro testování byly zvoleny teploty 37°C a 39 °C. Přítomnost zkrácené varianty genu *prp45(1-169)* v genomu neumožňuje buňkám přežít ani v jedné z testovaných teplot, ale při drobné nadprodukci zkrácené varianty *prp45(1-168)* z plazmidu s ADH promotorem v kmeni AVY11 dochází k nepatrnému zlepšení viability při 37°C, nikoliv ve 39°C. Divoká alela genu *PRP45*, jak pod vlastním promotorem, tak i exprimovaná z ADH promotoru je schopná potlačit citlivost ke zvýšené kultivační teplotě v obou testovaných restriktivních teplotách. Kmen AVY11 je vhodným kandidátem pro hledání syntheticky lethálních interakčních partnerů mutace *prp45(1-169)*.



30°C

37°C

39°C



Obr. 4.3. Růst kmene AVY11 samotného a transformovaného vybranými plazmidy.

Buňky byly kultivovány tři dny na médiu YPAD v teplotě 30°C a v nepermisivní teplotě 37°C a 39°C.

4.2 UV mutagenese a hledání klonů vykazujících syntheticky lethální interakci

Nejprve byla UV mutagenese a vyhledání klonů vykazujících synthetickou lethaltitu provedena u kmene FPY4B a následně byl totožný postup zopakován i u kmene opačného párovacího typu, AVY11.

4.2.1 UV mutagenese

Kmeny FPY4B a AVY11 byly transformovány plazmidem pOG02 a selekce buněk obsahujících plazmid byla učiněna na základě uracilové prototrofie. Poté bylo kulturou zaočkováno přibližně 20 ml tekutého minimálního SD média bez uracilu (nezbytnost udržení vneseného plazmidu pOG02). Kultivace třepané kultury probíhala do pozdní stacionární fáze při teplotě 30°C a pohybovala v rozmezí tří až pěti dní. V případě kmene AVY11 byl přidán do minimálního SD média adenin (30 mg/l, vyjma poslední VI. série), protože dle pozorování zjištěných při předešlé kultivaci kmene FPY4B, buňky strádaly nedostatkem adeninu v médiu. Před UV mutagenesí bylo spočteno množství buněk v 1 ml kultury pomocí Bürkerovy komůrky. Připravená kultura byla ředěna deionizovanou vodou na výslednou koncentraci 10^6 buněk/ml. Náhodná mutagenese byla provedena pomocí ultrafialového záření (vlnová délka 254 nm) v přístroji Stratalinker UV Crosslinker (Stratagene, USA) ve skleněné Petriho misce o průměru 90 mm (bez horního víka) v tenké vrstvě deionizované vody (objem ozařované suspenze 7 ml). Energie použitá pro ozařování byla postupně zvyšována (0-40 mJ/cm²), mezi jednotlivými dávkami záření byly odebírány vzorky, které byly vysety na médium YPD. Při porovnání počtu narostlých kolonií z odběru 0 mJ/cm² (neozařovaná suspenze buněk) a max. použité hodnoty energie ozařování lze odvodit vztah pro přežívání buněk po ozáření určitou hodnotou energie. Tento vztah se označuje *killing* a jeho hodnota se v ideálním případě pohybuje v rozmezí 2-10% přežití (Koren *et al.*, 2003).

Po vysetí ozařované suspenze na médium YPD dochází k rychlé ztrátě plazmidu pOG02 z rostoucí populace buněk vznikající kolonie za předpokladu, že nedošlo k narušení žádného genu, který by byl v genetickém vztahu s *prp45(1-169)*. Pokud však vznikl syntheticky lethální stav, nastává u buněk závislost na plazmidu pOG02, která se projevuje celočerveným zabarvením kolonií (přítomen gen *ADE3*). Vlastní fenotyp postupné ztráty plazmidu lze rozdělit do dvou skupin. Dojde-li ke ztrátě brzy

po výsevu buněk na bohaté médium, tzn. po pár děleních, kolonie jsou obvykle již celobílé barvy. Nastává-li ztráta postupně, lze nalézt u kolonií bílé sektory na červeném podkladu. Tento jev se označuje jako tzv. sektorování (viz. obr. 4.4).



Obr. 4.4. Tvorba bílých sektorů u původně červených kolonií s využitím systému *ADE2/ADE3*. YPD médium s 4% koncentrací glukózy, kultivováno pět dní v termostatu při 30°C.

Energie užívaná při UV mutagenезi byla pro každý z kmenů nastavována individuálně, neboť jak je patrné z tab. 4.1, oba kmeny se vzájemně lišily citlivostí na použitou intenzitu záření. Míra přežívání buněk po mutagenезi byla dána zejména aktuálním fyziologickým stavem kultury a tento stav se lišil mezi jednotlivými kultivacemi. Z výsledků doby kultivace před UV mutagenезí a účinností záření proto nelze odvodit přímou závislost.

	série	doba kultivace před UV mutagenézí (dny)	max. použitá energie ozařování (mJ/cm ²)	přežívání (%)
FPY4B	I.	2	25	10
	II.	4	40	8
	III.	8	40	13
	IV.	3	40	3
	V.	5	40	2
	VI.	7	40	13
AVY11	I.	5	40	<1
	II.	5	40	<1
	III.	3	30	2
	IV.	3	30	1
	V.	4	30	3
	VI.*	4	30	1

Tab. 4.1. Přehled jednotlivých sérií náhodné UV mutagenезe u kmenů FPY4B a AVY11.

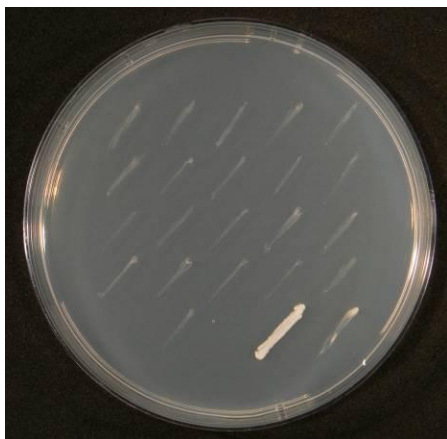
* nebyl přidán navíc adenin do minimálního SD média u kmene AVY11.

4.2.2 Potvrzení klonů vykazujících syntetickou lethaltu

K výběru celočervených kolonií po UV ozařování byla využita binokulární lupa. Kolonie celočerveného zabarvení byly dvakrát přečárovány na plotny s bohatým YPD médiem. Získané klony byly posléze testovány na schopnost růstu na médiu obsahujícím 5-FOA. Vznikl-li vztah syntetické lethality mezi studovaným genem s chybějící C-koncovou částí, *prp45(1-169)*, a mutací v neznámém genu, nejsou buňky schopné ztráty plazmidu pOG02 a růstu na médiu s 5-FOA.

Celkem bylo od kmene FPY4B získáno 24 potenciálních kandidátů, z nichž na médiu s 5-FOA nebylo schopno vyrůst 16 (viz. obr. 4.5). U kmene AVY11 se podařilo nalézt 48 celočervených kolonií, syntetická lethaltita se potvrdila u 25 (viz. obr. 4.6). Mgr. Ondřej Gahura našel již dříve pět synteticky lethálních klonů pocházejících od kmene FPY4B. Klony nesou označení FPY4B #1, #2, #3, #5 a #12. Nové klony nalezené v této práci byly pojmenovány dle zavedeného systému značení a doplnily chybějící místa v číselné řadě.

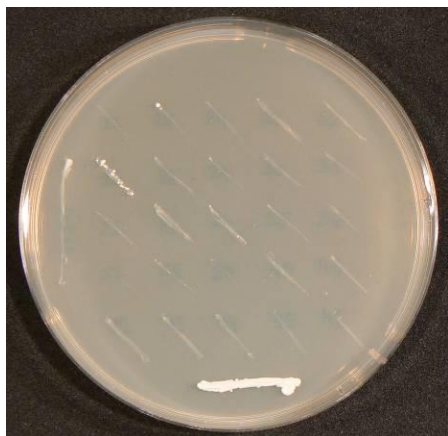
U kmene AVY11 bylo nalezeno dalších osm klonů, které drobně poporůstaly na médiu s 5-FOA, označení: AVY11 #47, #48, #49, #50, #51, #52, #53 a #54. S největší pravděpodobností se nejedná u těchto klonů přímo o stav syntetické lethality, ale o genetickou interakci označovanou jako syntetické oslabení růstu (synthetic growth defect). Klony jsou schopny částečného růstu na médiu s 5-FOA, protože synteticky oslabený růst není pro buňky zcela lethální, ale ani jim neumožňuje normální růst. Uvedený vztah mezi geny je pozoruhodný, ale další průběh charakterizace neznámých genů by byl metodicky obtížný, a proto se s nimi v této práci již dále nepracovalo.



#1*	#2*	#3*	#4	#5*
#6	#7	#8	#9	#10
#11	#12*	#13	#14	#15
#16	#17	#18	#19	#20
	#21		FPY4B	GRF18

Obr. 4.5. Pro kmen FPY4B bylo nalezeno celkem 21 syntheticky lethálních klonů.

Mgr. Ondřej Gahura našel již dříve pět mutantních klonů (klony označené *) a v této práci bylo připraveno dalších šestnáct. Kultivováno po dobu čtyř dní při teplotě 30°C. Kmen FPY4B je schopen růstu na médiu s 5-FOA, protože vykazuje auxotrofii k uracilu, kmen GRF18 slouží jako pozitivní kontrola (funkční *URA3* gen).



GRF18	#22	#23	#24	#25	#26
	#27	#28	#29	#30	#31
	#32	#33	#34	#35	#36
	#37	#38	#39	#40	#41
	#42	#43	#44	#45	#46
	AVY11				

Obr. 4.6. U kmene AVY11 bylo nalezeno 25 syntheticky lethálních klonů.

Kultivace buněk probíhala po dobu čtyř dní v termostatu při teplotě 30°C. Negativní kontrola je zastoupena kmenem AVY11 (nefunkční *URA3* gen), pozitivní kontrolu představuje kmen GRF18.

poznámka: Klon AVY11 #27 slabě poporůstá na médiu s 5-FOA, ale jeho růst je méně intenzivní při porovnání s klony syntheticky oslabeného růstu.

4.3 Fenotypová charakterizace mutantních klonů

V závislosti na charakteru vytvořené mutace v neznámém genu lze pozorovat různé fenotypové projevy u klonů vykazujících vztah syntetické lethality. Mezi studované vlastnosti patří např. dominantně negativní fenotypový projev mutantní alely nebo teplotní sensitivita.

4.3.1 Citlivost klonů k rozdílným teplotám

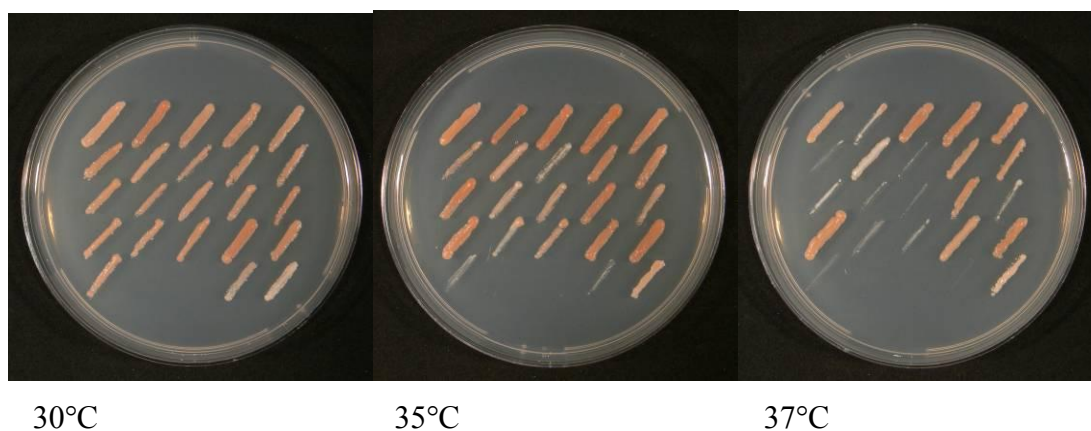
Plazmid pOG02 nese divokou alelu genu *PRP45* a je tedy schopen obnovit růst buněk při jinak restriktivní teplotě 37°C (i 39°C) jak kmene AVY11 (viz. kap. 4.1.2) tak FPY4B (Gahura *et al.*, přijato do tisku). Případný nález citlivosti ke zvýšené nebo snížené kultivační teplotě u mutantních klonů lze přiřadit dvěma možným původcům. První možnost představuje mutace v genu nebo jeho okolní sekvenci, která je odpovědná za vznik synteticky lethálního stavu. Druhou variantu lze přisoudit jiné případně dalším mutacím, které vznikly v některých buněčných genech a nejsou ve vztahu syntetické lethality. Souhrou náhod došlo k tvorbě více na sobě nezávislých mutací způsobených ozařováním.

Teploty, pro určení případné citlivosti nalezených klonů, byly zvoleny 23°C, 35°C a 37°C. Celkově byl pozorován pomalejší růst klonů odvozených od kmene AVY11 a tento rozdíl je zřejmě způsoben rozlišným genetickým pozadím. U žádného z nalezených mutantních klonů nebyla zjištěna citlivost k teplotě 23°C, nižší teplota testována nebyla. Výsledky zobrazují obr. 4.7 a 4.8, citlivost k teplotě 37°C shrnuje tab. 4.2.

	částečně citlivé k teplotě 37°C	neschopné růstu ve 37°C
klony odvozené od FPY4B	#2*, #7 a #11	#6, #8, #12*, #13, #15, #17, #18 a #21
klony odvozené od AVY11	#25, #28, #31, #38, #41, #42 a #45	#27 a #30

Tab. 4.2. Citlivost 21 klonů odvozených od kmene FPY4B a 25 klonů pocházejících od kmene AVY11 k restriktivní teplotě 37°C.

Klony označené * byly připraveny Mgr. Ondřejem Gahurou.



#1*	#2*	#3*	#4	#5*
#6	#7	#8	#9	#10
#11	#12*	#13	#14	#15
#16	#17	#18	#19	#20
#21			FPY4B +pHT4467Δ	FPY4B +pOG02

Obr. 4.7. Test růstu 21 klonů odvozených od kmene FPY4B v teplotě 30°C, 35°C a 37°C.

Buňky byly kultivovány tři dny na minimálním SD médiu bez uracilu při vybrané teplotě. Kmen FPY4B transformovaný plazmidem pHT4467Δ byl použit jako negativní kontrola; teplotně citlivá varianta *prp45(1-169)* k 37 °C. Pozitivní kontrola je zde zastoupena kmenem FPY4B obsahujícím plazmid pOG02 s divokou alelou genu *PRP45*.

Klony označené* byly připraveny Mgr. Ondřejem Gahurou.

poznámka: Plazmid pOG02 vznikl klonováním genu *PRP45* do plazmidu pHT4467Δ.



30°C

35°C

37°C

#22	#23	#24	#25	#26
#27	#28	#29	#30	#31
#32	#33	#34	#35	#36
#37	#38	#39	#40	#41
#42	#43	#44	#45	#46
		AVY11 +pHT4467Δ	AVY11 +pOG02	

Obr. 4.8. Test růstu 25 klonů odvozených od kmene AVY11 v teplotě 30°C, 35°C a 37°C. Buňky byly kultivovány čtyři dny na minimálním SD médiu bez uracilu při vybrané teplotě. Kmen AVY11 transformovaný plazmidem pHT4467Δ slouží jako negativní kontrola. Pozitivní kontrolu představuje kmen AVY11 nesoucí plazmid pOG02.

poznámka: Klon AVY11 #35 roste při porovnání s ostatními klony výrazně pomaleji.

4.3.2 Projev systému *ADE2/ADE3* u získaných klonů a ověření účinnosti transformace

Při růstu mutantních klonů na médiích s limitujícím množstvím adeninu (kultivováno ve 30°C, nedokumentováno) byla pozorována rozlišná míra intenzity zabarvení kolonií. Vzhledem k dalšímu postupu práce založenému právě na systému *ADE2/ADE3* bylo vhodné získané klony porovnat a vybrat takové, které budou splňovat požadované vlastnosti na intenzitu zabarvení kolonií. U tří klonů pocházejících od kmene AVY11, #25, #42 a #46, docházelo ke vzniku kolonií s velmi slabou intenzitou zabarvení, proto byly z další práce vyřazeny. V případě klonů AVY11 #22 a #27 se tvoří tmavě červené a světle narůžovělé kolonie. Obě různě intenzivně zbarvené kolonie byly testovány na růst na médiu s 5-FOA. U klonu #22 byla pro obě barevné verze syntetická lethality potvrzena. Klon #27 slabě poporůstá na médiu s 5-FOA, a to jak v případě testování tmavě červené, tak také světle růžové kolonie (drobný růst je ve shodě s předešlými výsledky, obr. 4.6). Z testování zde zmiňovaných klonů vyplývá, že různá intenzita zbarvení nemá souvislost se vztahem k syntetické lethalitě. Pro svůj drobný růst na médiu s 5-FOA byl klon AVY11 #27 z dalších pokusů vyřazen.

Identifikace genu obsahujícího mutaci synteticky lethální s *prp45(1-169)* bude provedena na základě transformace genomovou knihovnou. Pro testování účinnosti transformace u jednotlivých mutantních klonů byl použit vektor YEp13 (*LEU2*, *amp^R*, 2μ), protože knihovna byla připravena právě v uvedeném vektoru (Nasmyth a Tatchell, 1980). Transformaci bylo podrobáno všech 37¹¹ mutantních klonů (vyjma vyřazených klonů výše) a selekce buněk nesoucích požadovaný plazmid byla provedena na minimálním SD médiu bez leucinu. Klony FPY4B #21 a AVY11 #35 se dařilo transformovat s velice nízkou frekvencí, která se v případě klonu #35 blížila téměř nulové hodnotě. Mutace způsobené u těchto dvou klonů byly pravděpodobně natolik závažné, že i kultivace v tekutých médiích byla velmi obtížná, a proto bylo rozhodnuto s nimi dále nepracovat. U kmene FPY4B byl z důvodu zhoršeného růstu vyřazen také klon #12 (osobní sdělení Mgr. Ondřeje Gahury). U ostatních klonů bylo dosaženo účinnosti srovnatelné s výchozími kmeny¹².

¹¹ Nezahrnuté klony nalezené Mgr. Ondřejem Gahurou.

¹² Účinnost transformace byla posouzena ze dvou nezávislých pokusů LiAc transformace.

4.3.3 Dominantně negativní projev mutantní alely

Projev mutace nesoucí označení dominantně negativní lze posuzovat v *S. cerevisiae* s diploidním počtem chromosomů, tzn. za přítomnosti divoké a mutované formy téhož genu. V případech, kdy vytvořená mutace umožňuje např. silněji enzymu vázat jeho substrát, nebo je-li mutovaný protein sám o sobě aktivnější v porovnání s divokou verzí, může docházet ke stavu, kdy v buňce funkčně převažuje proteinový produkt mutované alely nad alelou divokou. Dominantně negativní projev mutace neumožňuje při transformaci genomovou knihovnou identifikaci divoké alely genu, jenž je zodpovědný za stav syntetické lethality.

Pro vyloučení klonů s dominantně negativním efektem mutantní alely bylo využito křížení mutantního klonu s kmenem opačného párovacího typu, který nebyl podroben ozařování. Kříženci obsahovaly od obou rodičů *prp45(1-169)*, od jednoho z rodičů (mutantní klon) získaly mutantní a od druhého (neozařovaný kmen AVY11 či FPY4B) divokou alelu příslušného genu. Bude-li se mutace v neznámém genu chovat dominantně negativně, tzn. že neumožní divoké alele se projevit, nebudou kříženci schopni ztratit plazmid pOG02 za neselektivních podmínek. Stav syntetické lethality bude trvat i nadále.

Dominantně negativní projev u klonů odvozených od kmene FPY4B (celkem 19):

mutantní klony odvozené od kmene **FPY4B**:

*MATa prp45(1-169)-HA::kanMX6 ade2 ade3 his3 leu2 ura3 xxx*¹³
+ plazmid **pOG02** (*PRP45*, *ADE3*, *URA3*, *amp*^R, *cenΔ*)

kmen **AVY11**: *MATa prp45(1-169)-HA::kanMX6 ade2 ade3 his3 leu2 trp1 ura3*
+ vektor **YEp13** (*LEU2*, *amp*^R, 2μ)

Ověření diploidů:

- prototrofie k aminokyselině leucin (vektor YEp13 u kmene AVY11)
- prototrofie k uracilu (plazmid pOG02 u mutantních klonů kmene FPY4B)

Před křížením bylo nezbytné kmen AVY11 transformovat vektorem YEp13, selekce proběhla na základě leucinové prototrofie. Mutantní klony odvozené od kmene FPY4B obsahují plazmid pOG02, který umožňuje přežití na médiu bez uracilu.

¹³ Mutace v neznámém genu synteticky lethální s *prp45(1-169)*.

Křížení probíhalo na bohatém médiu YPAD a vzniklí diploidi byli selektováni na minimálním SD médiu bez uracilu a leucinu. Poté byli získaní potomci dvakrát ponecháni růst na médiu YPD, které zajišťovalo možnost sledování přítomnosti plazmidu pOG02 na základě systému *ADE2/ADE3*. U všech 19 testovaných klonů došlo k tvorbě sektorů, tedy ztrátě plazmidu pOG02. Žádný klon odvozený od kmene FPY4B nevykazuje dominantně negativní charakter mutantní alely.

Dominantně negativní projev u klonů odvozených od kmene AVY11 (celkem 20):

mutantní klony odvozené od kmene **AVY11**:

MATa prp45(1-169)-HA::kanMX6 ade2 ade3 his3 leu2 trp1 ura3 xxx

+ plazmid **pOG02** (*PRP45, ADE3, URA3, amp^R, cenΔ*)

kmen **FPY4B**: *MATa prp45(1-169)-HA::kanMX6 ade2 ade3 his3 leu2 ura3*

Ověření diploidů:

- prototrofie k aminokyselině tryptofan (kmen FPY4B)
- prototrofie k uracilu (pOG02 u mutantních klonů kmene AVY11)

Při křížení klonů odvozených od kmene AVY11 s kmenem FPY4B byla využita k selekci diploidů opět přítomnost plazmidu pOG02 v mutantních buňkách. Kmen FPY4B je prototrofní na aminokyselinu tryptofan. Výběr diploidních buněk po křížení na bohatém médiu YPAD tedy probíhal na minimálním SD médiu bez uracilu a tryptofanu. Celkem bylo kříženo 20 klonů pocházejících od kmene AVY11, ani jeden z testovaných klonů dominantně negativní projev mutace nevykazoval.

U žádného z klonů nalezených pomocí UV ozařování nebyl potvrzen dominantní efekt mutantní alely. Klony FPY4B #2, #7 a AVY11 #24, #29 a #40 vytváří sektory slaběji v porovnání s ostatními klony. Mutace přítomné v genech, respektive jimi vyvolané eventuální aminokyselinové záměny v proteinových produktech mohou umožňovat proteinům např. přednostní schopnost vazby. Nicméně poměry zastoupení mutované a divoké varianty nedosahují takové frekvence jako v případě dominantně negativního projevu. Mutace u ostatních klonů vykazují recesivní charakter.

4.4 Rozdělení klonů do komplementačních skupin

Rozdělení mutantních klonů do komplementačních skupin usnadňuje identifikaci genů zodpovědných za stav synthetické lethality. Vlastní princip je podobný již představenému postupu pro určení dominantně negativního projevu mutantní alely v předchozí kapitole. Využívá se přístupu, který je založen na křížení dvou sad mutantních buněk vytvořených od kmenů opačného párovacího typu. V tomto případě je potřeba mutantní klony odvozené od kmene jednoho párovacího typu křížit se všemi klony pocházejícími od kmene s opačným párovacím typem. Systém je založen na schopnosti vzájemné komplementace mutované alely genu jeho divokou alelou, ale pouze za předpokladu, že projev mutací nemá dominantně negativní charakter. Budou-li dva křížené klony nést mutace v rozdílných genech, pak jejich kříženec získá divoké alely od obou genů ve vztahu synthetické lethality a závislost na plazmidu pOG02 pomine. Pod označením komplementační skupina si lze představit kolekci klonů nesoucích různé mutace vytvořené v identickém genu.

Celkem bylo kříženo 19 klonů od kmene FPY4B s 20 klony odvozenými od AVY11. Před křížením bylo třeba klony pocházející od kmene AVY11 transformovat plazmidem, který nese selekční gen *LEU2*. Vektor pRS315 (*LEU2*, *amp^R*, *cen*) je centromerického typu a přítomnost centromery zajišťuje nižší pravděpodobnost ztráty při růstu na bohatém médiu (frekvence ztráty centromerického plazmidu při kultivaci buněk za neselektivních podmínek se pohybuje kolem 10^{-2} na buněčné dělení). Výběr transformovaných buněk se zakládal na schopnosti růstu na minimálním SD médiu bez leucinu.

mutantní klony odvozené od kmene **FPY4B**:

*MATa prp45(1-169)-HA::kanMX6 ade2 ade3 his3 leu2 ura3 xxx*¹⁴
+ **pOG02** (*PRP45*, *ADE3*, *URA3*, *amp^R*, *cenΔ*)

mutantní klony odvozené od kmene **AVY11**:

*MATα prp45(1-169)-HA::kanMX6 ade2 ade3 his3 leu2 trp1 ura3 yyy*¹⁵
+ plazmid **pOG02** (*PRP45*, *ADE3*, *URA3*, *amp^R*, *cenΔ*)
+ vektor **pRS315** (*LEU2*, *amp^R*, *cen*)

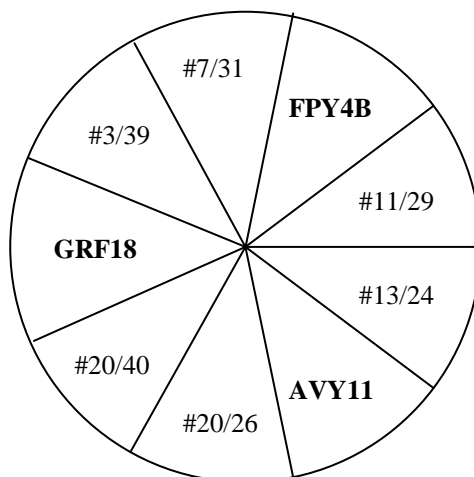
¹⁴ Zobrazuje mutaci v neznámém genu, označení xxx.

¹⁵ Zobrazuje mutaci v neznámém genu, označení yyy.

Ověření diploidů:

- prototrofie k aminokyselině tryptofan (kmen FPY4B)
- prototrofie k aminokyselině leucin (vektor pRS315 u kmene AVY11)

Křížení bylo provedeno v mikrotitrační 96-jamkové destičce a každý klon odvozený od kmene jednoho párovacího typu byl křížen se všemi klony pocházejícími od kmene s opačným párovacím typem. Čerstvě narostlá kultura buněk byla převedena z pevného média do 2 ml tekutého bohatého média YPAD a poté byla připravená suspenze buněk po 20 µl pipetována do jednotlivých jamek. Celkový objem kultury (oba klony opačných párovacích typů) tedy činil 40 µl. Mikrotitrační destičky byly kultivovány po dobu šesti až osmi hodin při pokojové teplotě (cca 23°C).



komplementační sk.	zástupci
I.	#3 a #39
II.	#7 a #31
III.	#11 a #29
IV.	#13 a #24
V.	#20 a #26 a #40

Obr. 4.9. Test růstu diploidních kříženců na médiu s 5-FOA.

Celkem bylo nalezeno pět komplementačních skupin o dvou a více klonech, viz. přiložená tabulka. Diploidní kříženec #20/#40 drobně poporůstá na médiu s 5-FOA, ale tento růst lze považovat za zcela minimální, částečně patrně vyvolaný intragenovou supresí¹⁶. Kmeny AVY11 a FPY4B jsou auxotrofní k uracilu, a proto jsou schopné růstu na médiu s 5-FOA. Kmen GRF18 zastupuje pozitivní kontrolu.

¹⁶ Jednotlivé mutace nacházející se v rámci identického genu u dvou rozdílných klonů mohou být vzájemně komplementovány u diploidního křížence.

Poté byla horní část média opatrně odsáta a sediment byl resuspendován ve zbylém objemu. Od každého křížení bylo 5 μ l suspenze kapáno na selekční pevné SD médium a ponecháno kultivovat čtyři dny v termostatu při 30°C. Získané kolonie diploidních buněk byly přečárovány opět na selekční médium. Za předpokladu, že nedošlo ke vzniku mutace v identickém genu, diploidní buňky mohou ztratit plazmid pOG02 (uracil je přítomen v selekčním médiu). Pro zajištění optimálních podmínek byly poté buňky nanесeny na bohaté médium YPD. Celkem bylo nalezeno šest diploidních kříženců, kteří vykazovali i za neselekčních podmínek celočervené zbarvení kolonií (viz. obr. 4.9).

Ostatní klony představují komplementační skupiny o jediném zástupci, eventuálně se nepodařilo nalézt klon nesoucí mutaci ve stejném genu, který by byl ale odvozen od kmene s opačným párovacím typem. Je možné, že u klonů pocházejících od totožného kmene (všechny mají stejný párovací typ) se může vyskytovat několik jedinců s mutacemi v identickém genu. Relativně malý počet nalezených komplementačních skupin napovídá o velkém množství genetických interakcí mutace *prp45(1-169)*.

4.5 Vyloučení klonů vykazujících synthetickou lethality s *ade3* nebo *ura3*; potvrzení genetického vztahu s *prp45(1-169)*

Plazmid pOG02 obsahuje kromě genu *PRP45* i další dva geny důležité pro testování synthetické lethality, *ADE3* a *URA3* (viz. obr. 4.1). V databázi Saccharomyces Genome Database (www.yeastgenome.org) byli pro alelu genu *ura3* nalezeni dva syntheticky lethální partneři, *fur1* a *fur4* a pro alelu *ade3* čtyři, *hip1*, *shm1*, *shm2* a *srp40*.

Z výše dokumentovaných nálezů lze vyvozovat, že v sadě mutantních klonů, které pocházejí od kmenů FPY4B a AVY11, se mohou vyskytovat i klony, které vykazují synthetickou lethality s mutacemi *ade3* nebo *ura3*, nikoliv s *prp45(1-169)*. Pro jejich vyloučení bylo použito postupu, který je založen na transformaci mutantních klonů jiným plazmidem nesoucím gen *PRP45*. Plazmid pOG02 umožňuje snadnou ztrátu z rostoucí populace buněk při kultivaci za neselektivních podmínek. Obsahují-li testované klony mutaci v genu, který je syntheticky lethální s *prp45(1-169)*, nastane po transformaci jiným plazmidem obsahujícím gen *PRP45* pozbytí závislosti na pOG02. Je-li však synthetická lethality zprostředkována geny *ura3* nebo *ade3*, ke ztrátě plazmidu pOG02 nemůže dojít a buňky nejsou schopné růst na médiu s 5-FOA. Pro testování synthetické lethality s *prp45(1-169)* byl využit již dříve představený plazmid YEp13-PRP45 (viz. kap. 4.1.2).

4.5.1 Potvrzení synthetické lethality s mutací *prp45(1-169)*

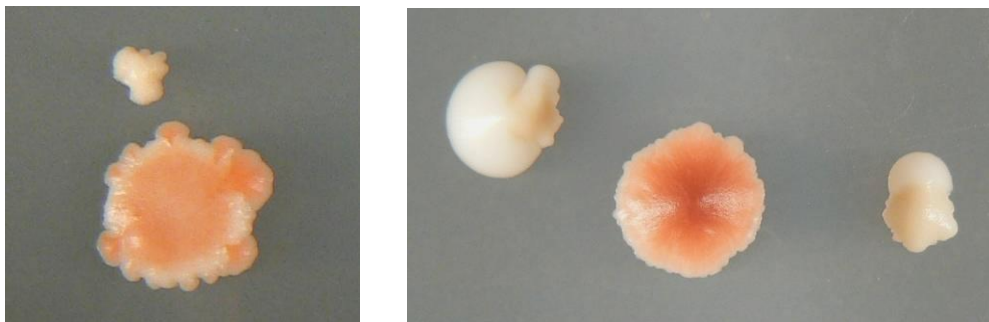
Pro testování mutantních klonů prostřednictvím transformace plazmidem YEp13-PRP45 byla využita a drobně upravena metoda zjednodušené LiAc transformace *S. cerevisiae* pocházející z laboratoře profesora Gietze (2006), viz. kap. 3.2.14, Rychlá LiAc transformace.

Mutantní klony byly podrobeny transformaci plazmidem YEp13-PRP45 (*PRP45*, *LEU2*, *amp^R*, 2μ). Selektce buněk, které obsahují plazmid, proběhla na minimálním SD médiu bez leucinu. Vztah synthetické lethality s mutací v genu *PRP45* nebylo možné v některých případech jednoznačně určit, protože charakter tvorby sektorů byl poněkud neobvyklý.

Mutantní klony byly rozděleny do čtyř kategorií. První kategorii (kategorie A) představuje buňky, které po transformaci plazmidem YEp13-PRP45 dávají vznik sektorujícím koloniím. Druhá kategorie je zastoupena klony s velice rychlou ztrátou plazmidu pOG02 projevující se tvorbou celobílých kolonií s minimálním náznakem červených sektorů.

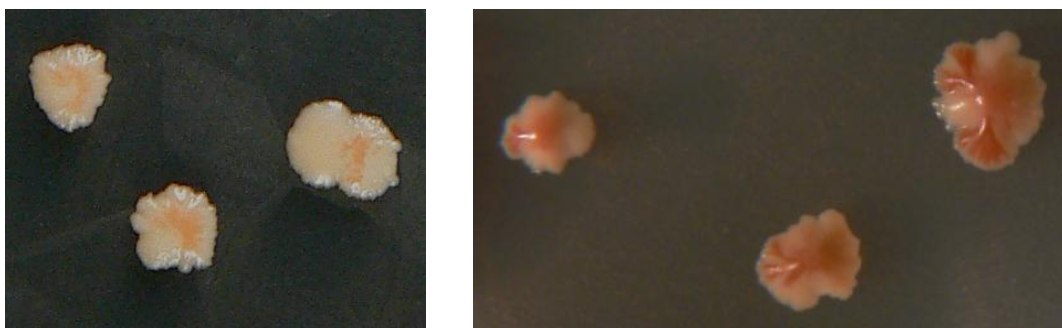
Třetí kategorie (kategorie C) obsahuje klony s „podivným“ projevem, u nichž po transformaci plazmidem YEp13-PRP45 dochází ke vzniku malých bílých kolonií a standardně rostoucích červených kolonií, které při okrajích obsahují velice slabé náznaky bílých sektorů (viditelné pouze pod binolupou). Buňky, které tvoří drobné bílé kolonie a velice slabě viditelné bílé sektory, nesou pouze plazmid YEp13-PRP45 a vykazují pomalejší růst. „Podivný“ fenotypový projev byl určen u všech mutantních klonů odvozených od kmene FPY4B, které byly připraveny v této práci. Při kultivaci buněk kmene FPY4B pro UV mutagenезi bylo pozorováno výrazné červené zabarvení třepané kultury, které souvisí s aktivací biosynthetické dráhy vzniku purinů (viz. kap. 2.4.2). Tato skutečnost by mohla vysvětlovat možnou růstovou závislost nalezených mutantních klonů právě na plazmidu pOG02 s funkčním genem *ADE3* (přestože buňky nemají ani v přítomnosti tohoto genu funkční biosynthetickou dráhu). Kultivace kmene AVY11 při šesté sérii UV mutagenезe proběhla za stejných podmínek, nicméně vytvořené mutantní buňky vykazují „normální“ projev po transformaci, viz. klony AVY11 #41 a #43.

Do kategorie D byly zařazeny dva klony, AVY11 #29 a #37, které vykazovaly velice slabou tendenci ke vzniku sektorů u červených kolonií, a klon AVY11 #30, jenž po transformaci plazmidem YEp13-PRP45 vytváří nepatrně zoubkaté kolonie porostlé drobnými kulovitými výrůstky (viz. obr. 4.11). U klonu AVY11 #29 se může jednat pouze o pomalejší průběh sektorování, protože mutovaná alela synteticky lethálního genu se projevuje „silněji“ vůči své divoké alele (viz. kap. 4.3.3). Oba klony byly po transformaci YEp13-PRP45 testovány na schopnost růstu na médiu s 5-FOA, kde klon AVY11 #37 nevyrostl. Pravděpodobně obsahuje mutaci v některém z genů, které jsou synteticky lethální s *ade3* nebo *ura3*.



Obr. 4.10. Klony transformované plazmidem YEp13-PRP45, které náleží do kategorie C s „podivným“ projevem.

Vlevo je znázorněn klon FPY4B #16 a vpravo FPY4B #12. Ztratí-li buňky plazmid pOG02 jsou velice rychle „předstiženy“ v růstu červenými (obsahují oba plazmidy), a proto je nemožné pozorovat přítomnost výrazných sektorů u buněk kategorie C. U drobných bílých kolonií dochází někdy k prolomení růstového omezení a z této původně malé kolonie vyrůstá větší čistě bílá „normálního“ charakteru.



Obr. 4.11. Klon AVY11 #30 po ztrátě plazmidu pOG02 nahrazeného YEp13-PRP45 vytváří kolonie ploššího fenotypového projevu s drobnými kulovitými výrůstky na povrchu.

Bílé části sektorující kolonie (obsahují pouze plazmid YEp13-PRP45) rostou více „naplocho“ oproti částem červeného zabarvení (buňky obsahují oba plazmidy exprimující gen *PRP45*).

Celkové shrnutí fenotypového projevu 35 testovaných klonů (+4 připravených Mgr. Ondřejem Gahurou) odvozených od kmenů FPY4B a AVY11 po transformaci plazmidem YEp13-PRP45:

kategorie A (sektorující kolonie):

#1¹⁷, #2¹⁷, #3¹⁷, #22, #23, #24, #26, #28, #32, #33, #34, #36, #38, #39, #41, #43 a #45

kategorie B (celobílé kolonie):

#31, #40 a #44

kategorie C (kolonie s „podivným“ fenotypem):

#4, #5, #6, #7, #8, #9, #10, #11, #13, #14, #15, #16, #17, #18, #19 a #20

kategorie D (ostatní):

#29 a #37: sektory nejsou téměř detekovatelné

#30: kolonie „zoubkaté“ a rostoucí „naplocho“

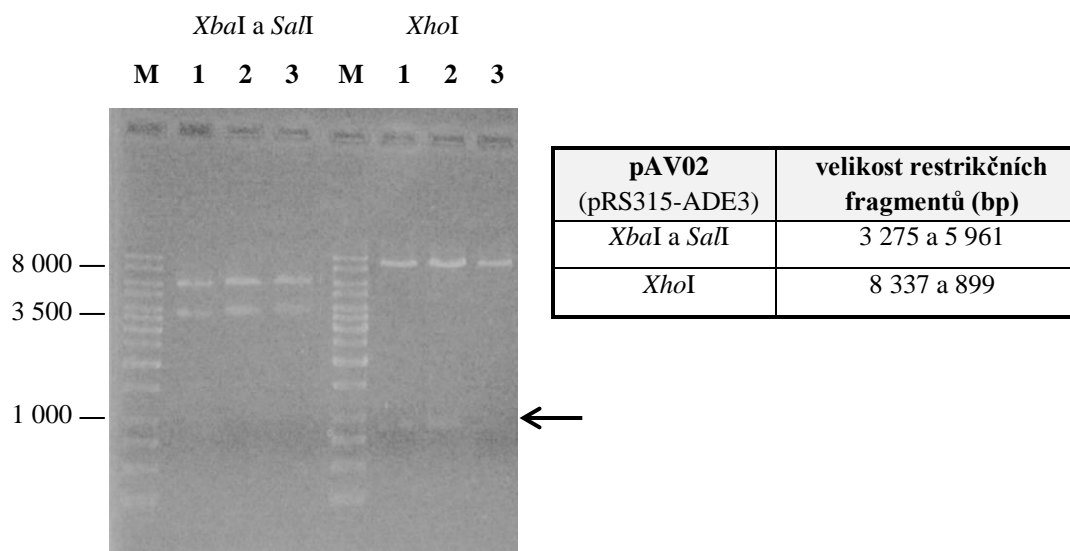
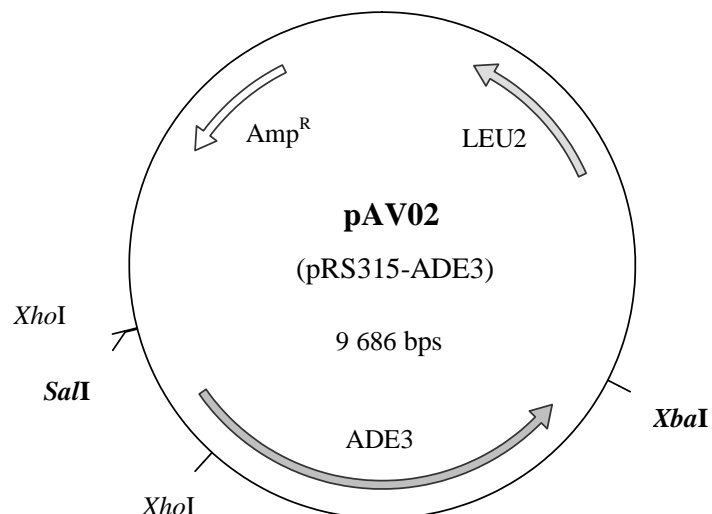
Pro ověření, zda získané mutantní klony vykazují skutečně vztah syntetické lethality s *prp45(1-169)*, byly připraveny plazmidy, které nesou geny *ADE3* a *URA3* odděleně.

4.5.2 Příprava plazmidu pAV02 (pRS315-ADE3)

Plazmid nesoucí gen *ADE3* byl připraven klonováním tohoto genu z plazmidu pOGO2 přes restrikční místa *Xba*I a *Sal*I do vektoru pRS315 (*LEU2*, *amp^R*, *cen*). Celková délka klonovaného fragmentu s genem *ADE3*, který je exprimován pod autologním promotorem, je 3 275 bp. Získaný plazmid byl restrikčně ověřen a shledán správným (viz. obr. 4.12).

Ověření plazmidu pAV02 z hlediska funkční exprese genu *ADE3* bylo prokázáno fenotypovým projevem na základě využití systému *ADE2/ADE3*. Plazmidem pAV02 (pRS315-ADE3) byl transformován kmen AVY11, který umožňuje sledovat přítomnost funkčního genu *ADE3* u buněk s genetickým pozadím *ade2* a *ade3*. Transformované buňky plazmidem pAV02, které byly selektovány na minimální SD médiu bez leucinu a se 4% koncentrací glukózy, vykazovaly po čtyřdenní kultivaci v termostatu při 30°C červené zabarvení kolonií.

¹⁷Mutantní klony připravené Mgr. Ondřejem Gahurou byly zařazeny dle fenotypového projevu do příslušné kategorie na základě osobního sdělení.



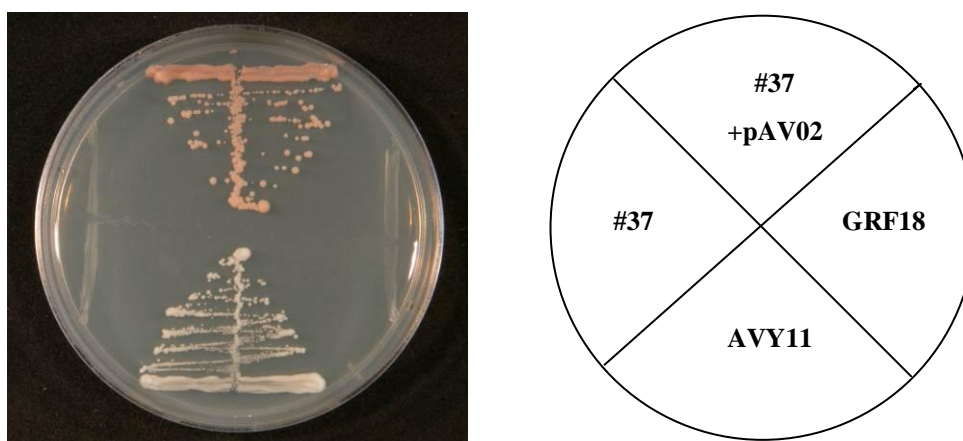
Obr. 4.12. Restrikční ověření a mapa plazmidu pAV02 (pRS315-ADE3).

Izolace plazmidové DNA byla provedena ze tří kolonií *E. coli* (na gelu značeno 1, 2 a 3). Vlevo je zobrazeno restrikční ověření enzymy *XbaI* a *SalI*, které byly použity pro klonování genu *ADE3*. Vpravo je kontrolní štěpení enzymem *XhoI*, který rozeznává dvě místa v plazmidu pAV02. Šipka označuje fragment velikosti 899 bp, který potvrzuje přítomnost genu *ADE3*. Použit 1% agarózový gel v TAE.

M velikostní marker GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (#SM0311; MBI Fermentas, Litva)

4.5.3 Nalezení klonů syntheticky lethálních s mutací *ade3*

Plazmidem pAV02 (pRS315-ADE3) bylo transformováno rychlou LiAc metodou všech 39 mutantních klonů. Selektce transformovaných buněk proběhla na minimálním SD médiu bez leucinu. Transformované klony byly poté testovány na schopnost růstu na médiu s 5-FOA, neboť závislost na plazmidu pOG02 v přítomnosti pAV02 nebylo možné pozorovat vizuálně. Oba zmíněné plazmidy, pOG02 i pAV02, obsahují gen *ADE3*, který způsobuje červené zbarvení kolonií. Nesou-li buňky mutaci v genu, který je syntheticky lethální s *ade3*, rostou v přítomnosti leucinového plazmidu s divokou alelou genu *ADE3* na médiu s 5-FOA. Synthetickou lethalitu s *ade3* vykazoval pouze klon AVY11 #37, který byl v předchozím testu po transformaci plazmidem YEp13-PRP45 zahrnut do kategorie D (viz. kap 4.5.1).



Obr. 4.13. Test růstu klonu AVY11 #37 na médiu obsahujícím 5-FOA po transformaci plazmidem pAV02.

Kmen GRF18 představuje pozitivní kontrolu účinku média s 5-FOA. Kmen AVY11 byl vybrán pro negativní kontrolu, protože obsahuje mutaci *ura3* (u obrázků v následujících kapitolách není přítomnost kontrolních kmenů GRF18 a AVY11 případně FPY4B na médiích s 5-FOA vysvětlována).

4.5.4 Příprava plazmidu pAV03 (pRS315-URA3)

Druhým plazmidem pro vyloučení klonů vykazujících synthetickou lethalitu s jinou mutací než *prp45(1-169)*, byl plazmid nesoucí gen *URA3*. Jako vhodný vektor pro jeho konstrukci byl opět vybrán pRS315. V porovnání s přípravou plazmidu pAV02 zde byl zvolen postup jiný, protože se nepodařilo nalézt vhodná restrikční místa pro klonování fragmentu s genem *URA3* z plazmidu pOG02.

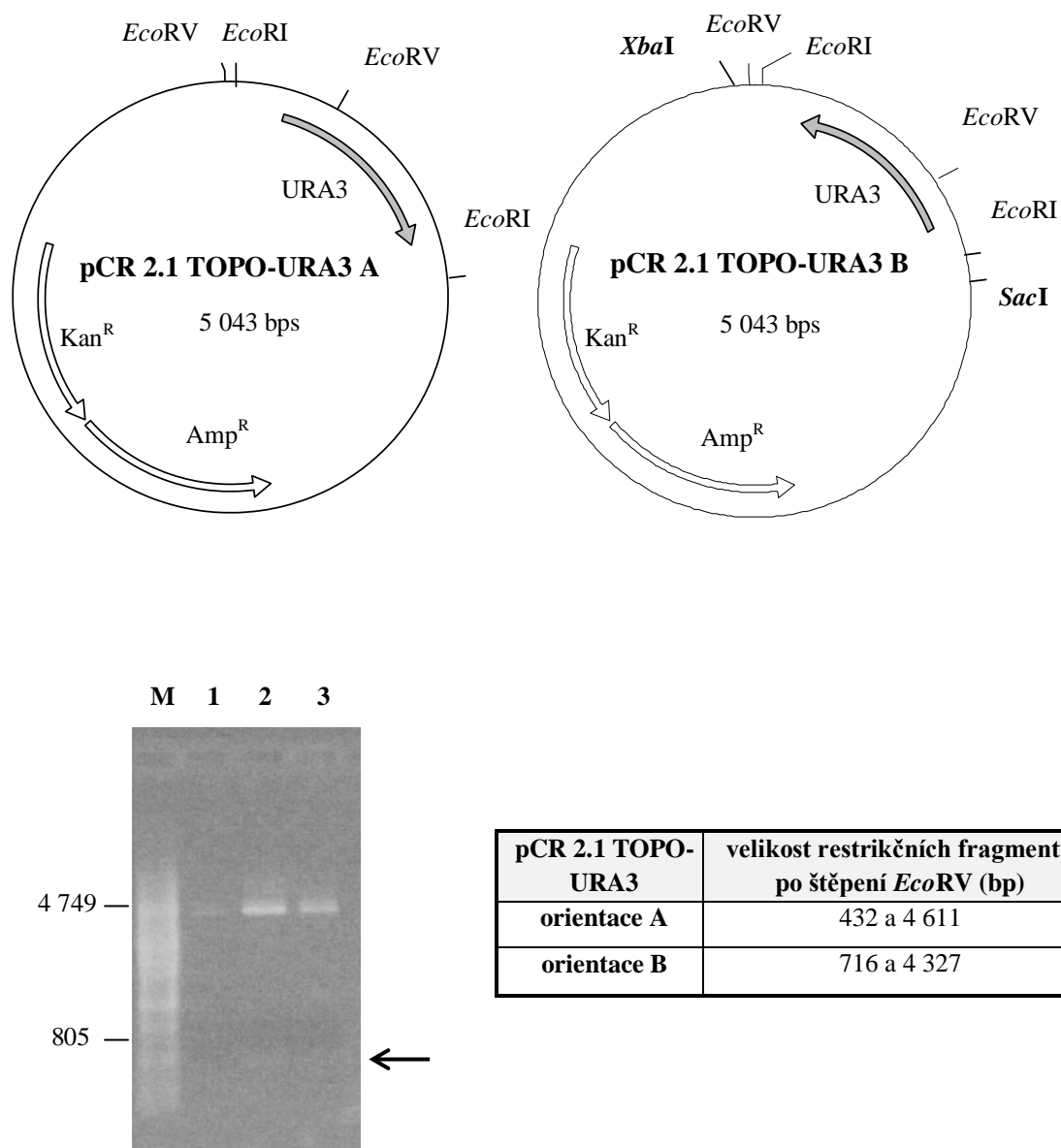
Pro amplifikaci úseku plazmidu pOG02, který obsahuje gen *URA3*, byly navrženy primery AV01 a AV02. Uvedená oblast byla vybrána na základě srovnání sekvence plazmidu pOG02 s úsekem genomové DNA *S. cerevisiae* (Saccharomyces Genome Database, www.yeastgenome.org). Výše zmíněné porovnání sloužilo pro zajištění přítomnosti promotorové a terminátorové části a regulačních sekvencí genu *URA3*. ORF genu tvoří 804 bp dlouhý úsek, celková délka klonovaného fragmentu činila 1112 bp. Fragment s genem *URA3* byl získán prostřednictvím PCR (program AV02).

Produkt PCR byl vložen do vektoru pCR 2.1 TOPO (*LacZ*, *kan^R*, *amp^R*) pomocí komerční soupravy TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, USA). Přítomnost fragmentu s genem *URA3* ve vytvořeném plazmidu byla ověřena PCR (program AV02, primery AV01 a AV02) z deseti kolonií *E. coli* bílé barvy. Před přidáním reakční směsi byly buňky vystaveny teplotě 95° po dobu 3 min. a poté ochlazeny na ledu (uvedený krok slouží k rozbití buněk a uvolnění DNA). Pozitivní produkt, který charakterizuje výskyt genu *URA3*, byl identifikován u devíti kolonií (data neuvedena).

program AV02:

1. 96°C 2 min
2. 94°C 30 s
3. 45°C 30 s
4. 72°C 1 min
5. 24krát opakovat kroky 2 až 4
6. 72°C 5 min
7. 10°C 30 s
8. konec

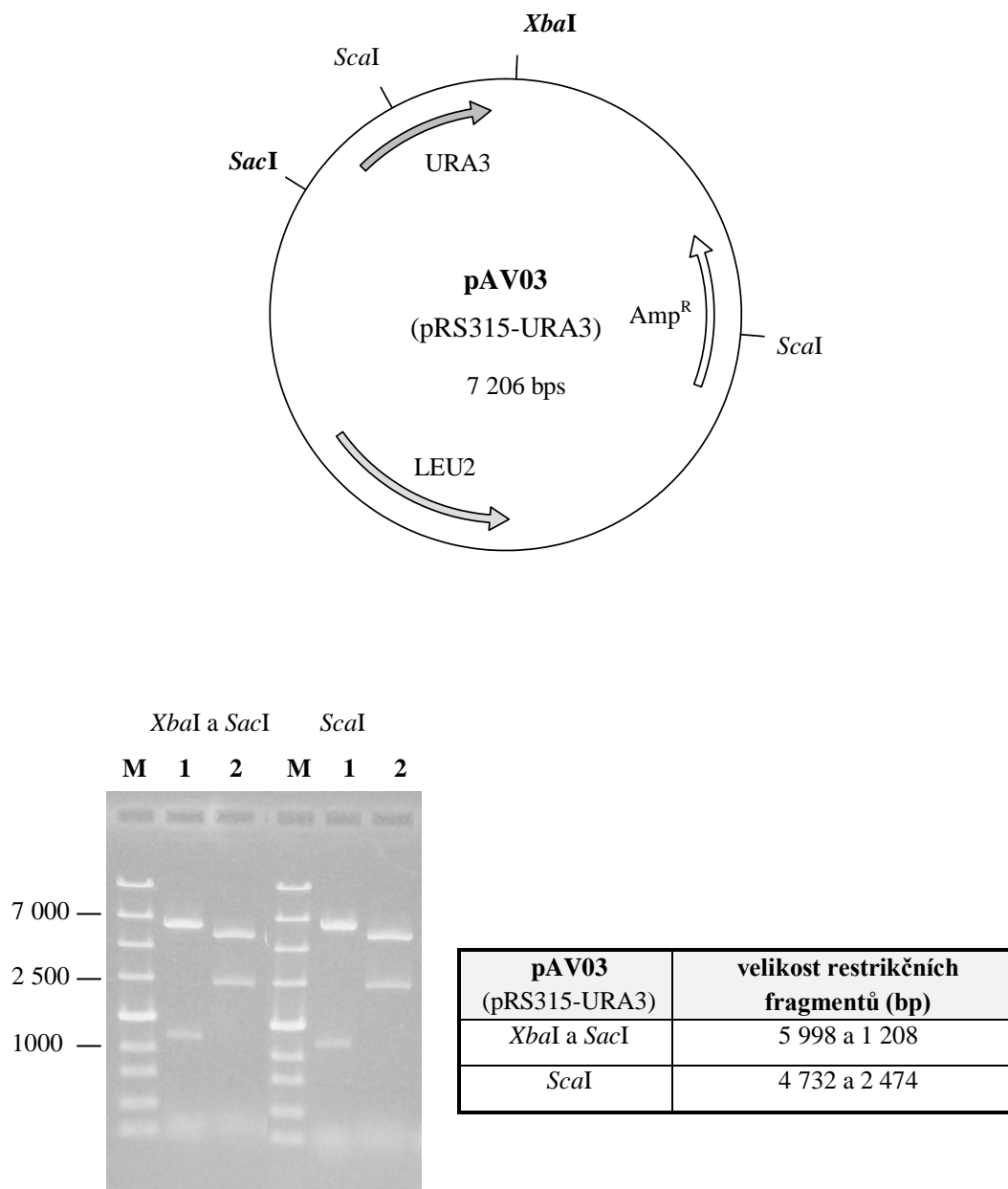
Izolovaný plazmid byl podroben restrikční analýze enzymem *EcoRV*. Při klonování fragmentu s genem *URA3* do vektoru pCR 2.1 TOPO mohlo dojít ke vzniku dvou různých způsobů orientace vloženého úseku. Uvedený enzym rozeznává dvě specifické sekvence ve vytvořeném plazmidu, jedno místo v původním vektoru a druhé ve vloženém fragmentu obsahujícím gen *URA3*. Výsledek štěpení byl shledán správným a pozitivním pro orientaci B (viz. obr. 4.14). Pro klonování genu *URA3* do cílového vektoru pRS315 (*LEU2*, *amp^R*, *cen*) byla zvolena restrikční místa *XbaI* a *SacI*. Restrikční ověření získaného plazmidu potvrdila přítomnost fragmentu odpovídající velikosti (viz. obr. 4.15). Připravený plazmid pRS315-*URA3* byl pojmenován pAV03. Funkčnost uvedeného plazmidu (pAV03; *URA3*, *LEU2*, *amp^R*, *cen*) byla prokázána transformací kmene AVY11 (*ura3* a *leu2*).



Obr. 4.14. Restrikční ověření a znázornění mapy plazmidu pCR 2.1 TOPO-URA3.

Plazmidová DNA byla izolována celkem ze tří kolonií *E. coli* (na gelu značeno 1, 2 a 3), které dávaly vznik specifickému produktu PCR, jenž detekoval přítomnost genu *URA3*. Šipka označuje *EcoRV* restrikční fragment velikosti 716 bp, který odpovídá orientaci B ve všech třech případech. Místo *EcoRI* na mapě ohraničuje oblast určenou pro vkládání produktů PCR. Použit 1% agarózový gel v TAE.

M velikostní marker Lambda DNA/PstI



Obr. 4.15. Restriční ověření a mapa plazmidu pAV03 (pRS315-URA3).

Izolace plazmidové DNA byla provedena ze dvou kolonií *E. coli* (na gelu značeno 1 a 2) a oba získané plazmidy byly podrobeny restriční analýze dvojicí enzymů, *Xba*I a *Sac*I, které byly použity pro klonování. Restriční endonukleáza *Sca*I potvrdila identitu získaného plazmidu. Použit 1% agarózový gel v TAE.

M velikostní marker ZipRuler™ Express DNA Ladder Set, 2 (#SM1378; MBI Fermentas, Litva)

4.5.5 Nalezení klonů vykazujících stav synthetické lethality s mutací *ura3*

Pro určení mutantních klonů, které vykazují stav synthetické lethality s mutací *ura3*, bylo 38 mutantních klonů transformováno rychlou LiAc metodou plazmidem pAV03 (pRS315-URA3). Selektce transformovaných buněk proběhla na základě leucinové prototrofie. Byla-li synthetická lethality podmíněna *ura3*, po transformaci plazmidem pAV03 se projeví tento stav ztrátou pOG02, která je vizuálně rozeznatelná tvorbou bílých sektorů na původně červených koloniích. Závislost na plazmidu pOG02 z důvodu synthetické lethality s mutací *ura3* nebyla identifikována u žádného z testovaných klonů (potvrzeno i testem růstu na médiu s 5-FOA).

4.6 Odhalení falešně pozitivních klonů

Před transformací genomovou knihovnou bylo třeba odhalit falešně pozitivní klony, které jsou závislé na genu *PRP45* neseném na pOG02 z jiného důvodu, než stavu syntetické lethality. Při UV ozařování mohlo dojít k zásahu do genomové zkrácené varianty *prp45(1-169)*, která se poté stala sama o sobě nefunkční či nedostačující životním potřebám buňky.

4.6.1 Příprava plazmidu pAV01 (p423ADH FUN20-ΔC5)

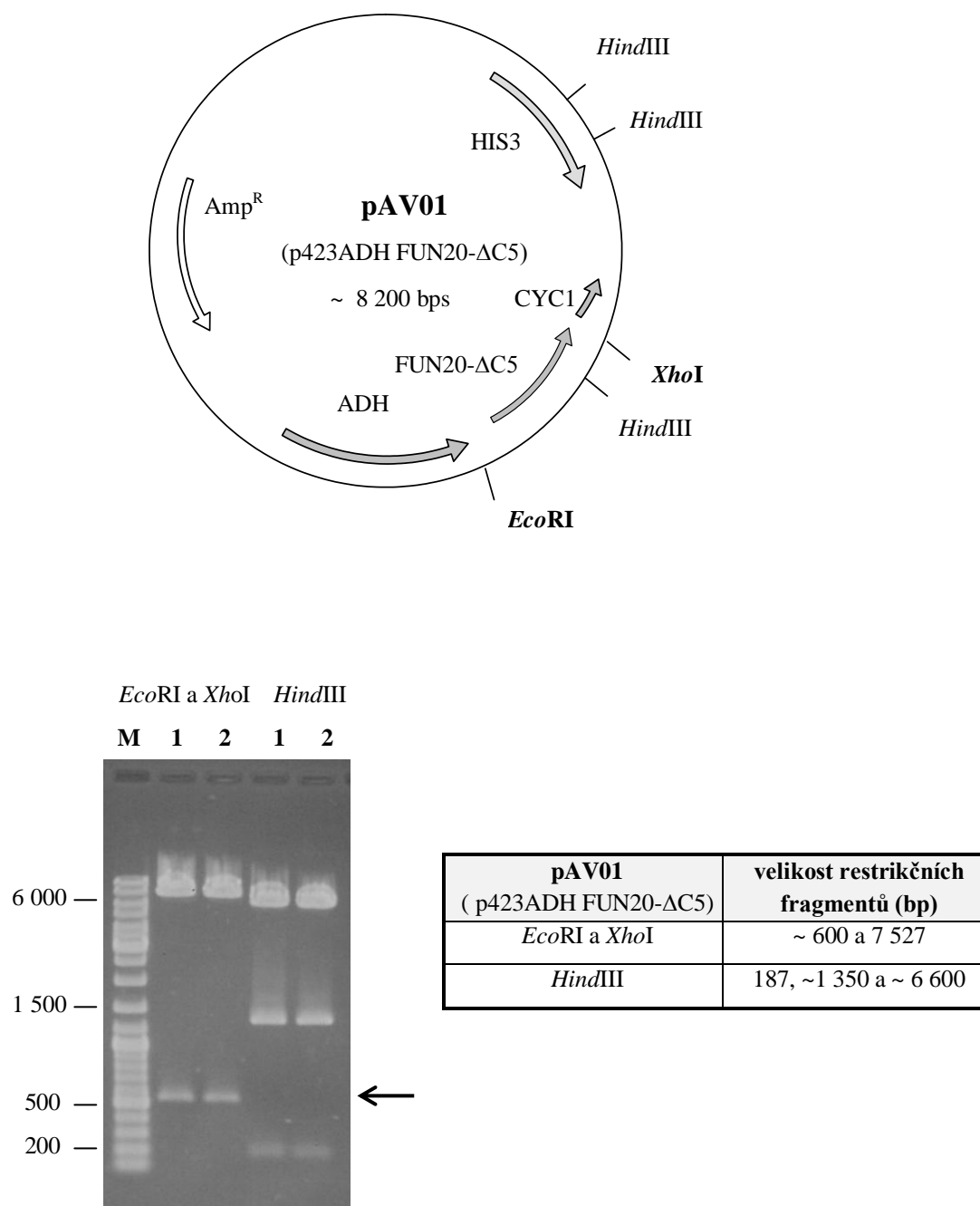
Plazmid p416ADH FUN20-ΔC5 (fragment s genem *prp45(1-168)*, ADH promotor, CYC1 terminátor; *URA3*, *amp^R*, *cen*; připravila Mgr. Kateřina Abrahámová, 2002) byl použit pro klonování úseku s *prp45(1-168)* přes restrikční místa *EcoRI* a *XhoI* do vektoru p423ADH (ADH promotor, CYC1 terminátor; *HIS3*, *amp^R*, 2μ).

Výběr kolonií *E. coli* nesoucích požadovaný plazmid byl proveden PCR (program AV01, primery KM01 a FP22) analyzující přítomnost fragmentu s *prp45(1-168)*. Před přidáním reakční směsi byly buňky vystaveny 95°C (3 min.) a následně ochlazeny na ledu. Celkem bylo testováno deset různých kolonií *E. coli* a produkt délky 169 bp byl zaznamenán u osmi (data neuvedena).

program AV01:

1. 96°C 2 min
2. 94°C 20 s
3. 40°C 30 s¹⁸
4. 72°C 2 min
5. 2krát opakovat kroky 2 až 4
6. 94°C 20 s
7. 52°C 30 s
8. 72°C 45 s
9. 19krát opakovat kroky 6 až 8
10. 72°C 5 min
11. 15°C 1 min
12. konec

¹⁸ Vzhledem ke skutečnosti, že oba zvolené primery, KM01 a FP22, nejsou plně komplementární s cílovou DNA, byly první tři cykly polymerázové řetězové reakce zvoleny s nižší teplotou tání. Ostatní cykly již probíhaly při teplotě vypočtené pro celé sekvence primerů.



Obr. 4.16. Restrikční ověření a mapa plazmidu pAV01 (p423ADH FUN20-ΔC5).

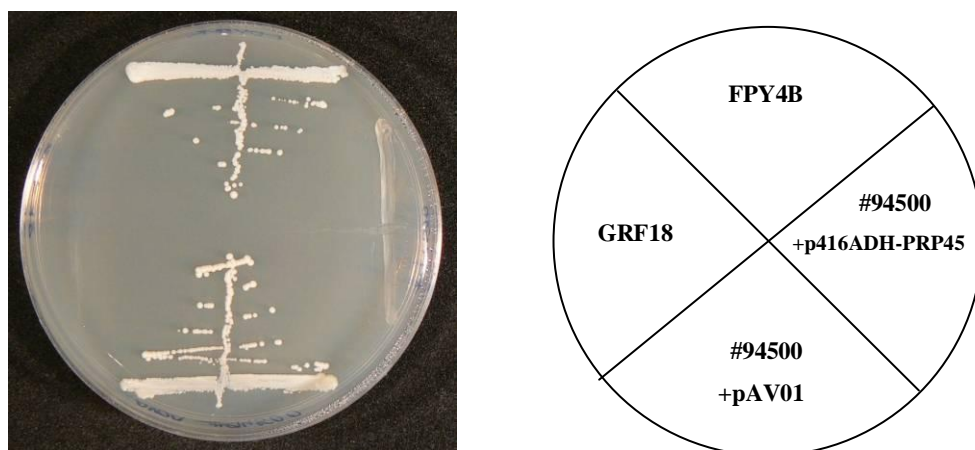
Plazmidy byly izolovány ze dvou kolonií *E. coli*, které byly pozitivně analyzovány na přítomnost fragmentu s *prp45(1-168)* (na gelu značeno 1 a 2). Restrikční ověření bylo provedeno enzymy *EcoRI* a *XhoI*, které byly použity pro klonování. Velikost klonovaného fragmentu je kolem 600 bp (příslušný fragment je označen šipkou). Předchozí kombinace enzymů i štěpení *HindIII* potvrdilo správnost izolovaného plazmidu. Analyzováno elektroforeticky na 1,2% agaróze v TAE.

M velikostní marker GeneRuler™ DNA Ladder Mix (#SM0331; MBI Fermentas, Litva)

Ze dvou pozitivních kolonií *E. coli* byl izolován plazmid, který byl následně restriktivně pozitivně ověřen (viz. obr. 4.16). Připravený plazmid byl pojmenován pAV01 (p423ADH FUN20-ΔC5). Pro zjištění, je-li vytvořený plazmid nesoucí zkrácenou variantu *prp45(1-168)* funkční a schopen zastat funkci *PRP45*, byla provedena transformace kmene #94500.

kmen **#94500-h**: MATa *prp45Δ0::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 trp1 ura3Δ0* + plazmid p416ADH-PRP45 (ADH promotor, CYC1 terminátor; *PRP45*, *URA3*, *amp^R*, cen)

Kmen #94500 nese selekční *KanMX4* kazetu vloženou na místo ORF genu *PRP45* (*prp45Δ0*). Při životě je kmen udržován přítomností plazmidu s *PRP45*, p416ADH-FUN20. Po transformaci plazmidem pAV01 byly buňky selektovány na minimálním SD médiu bez histidinu a poté testovány na médiu s 5-FOA (viz. obr. 4.17).



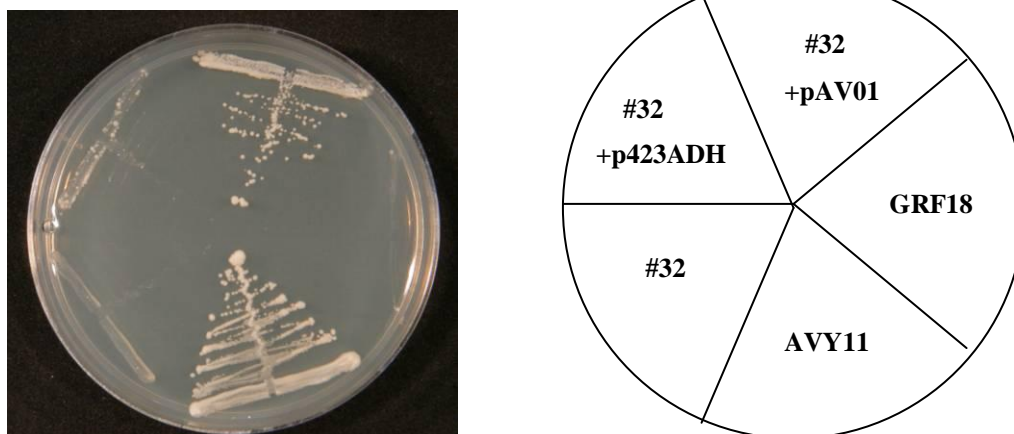
Obr. 4.17. Připravený plazmid pAV01 (p423ADH FUN20-ΔC5) je schopen zajistit přežití buněk kmene #94500 (*prp45Δ0*) při ztrátě p416ADH-PRP45, která je způsobena růstem na médiu s 5-FOA.

4.6.2 Vyloučení falešně pozitivních klonů

Gen *HIS3* není schopen v přítomnosti mutace *ade3* zajistit buňkám prototrofie k histidinu, *ade3* mutanta je zároveň auxotrofní na adenin i histidin (Daignan-Fornier a Fink, 1992; Rébora *et al.*, 2001 a 2005).

Transformace buněk histidinovým plazmidem byla možná pouze v přítomnosti divoké alely genu *ADE3* (plazmid pOG02). Selektce transformovaných buněk proběhla na minimálním SD médiu bez histidinu. Z výše uvedeného auxotrofního důvodu nebylo možné pozorovat ztrátu pOG02 na základě tvorby sektorů

na červených koloniích. Proto bylo zvoleno testování závislosti mutantních klonů na plazmidu pOG02 v přítomnosti pAV01 na médiu s 5-FOA. Zmíněné médium obsahuje histidin a buňky, které mohou plazmid pOG02 ztratit, tzn. že k životu jim postačuje zkrácená varianta *prp45(1-168)*, jsou schopné zde přežít. Testováno bylo všech 38 mutantních klonů a identifikován byl klon AVY11 #32, který obsahuje pravděpodobně nefunkční alelu *prp45(1-169)*.



Obr. 4.18. Klon AVY11 #32 transformovaný plazmidem pAV01 (p423ADH FUN20-ΔC5) je schopen růst na médiu s 5-FOA.

Po transformaci vektorem p423ADH je pozorován slabý růst, který lze považovat za negativní.

Celkem bylo v této a předchozí kapitole (kap. 4.5 a 4.6) testováno 39 mutantních klonů a závislost na plazmidu pOG02 prostřednictvím genu *PRP45* byla prokázána u 37. Jeden klon, AVY11 #37, byl vyloučen pro stav syntetické lethality s mutací *ade3* a další klon, AVY11 #32, pro závislost na plazmidu pOG02 s divokou alelou *PRP45* z jiného důvodu než stavu syntetické lethality.

Přehled klonů, které vykazují stav syntetické lethality s *prp45(1-169)*:

kmen **FPY4B** (celkem 19)

#1*	#2*	#3*	#4	#5*	#6	#7	#8	#9	#10
#11	#13	#14	#15	#16	#17	#18	#19	#20	

poznámka: klony označené * byly připraveny Mgr. Ondřejem Gahurou

kmen **AVY11** (celkem 18)

#22	#23	#24	#26	#28	#29	#30	#31	#33	#34
#36	#38	#39	#40	#41	#43	#44	#45		

4.7 Identifikace neznámých genů

Před transformací genomovou knihovnou bylo přistoupeno k přímému testování plazmidy, které nesou divoké alely genů, o nichž jsme se domnívali, že by mohly být genetickými interaktory mutace *prp45(1-169)*.

4.7.1 Přímé testování vybranými geny

Celkem bylo vybráno třináct genů, které byly rozděleny do tří skupin. První skupinu představují geny, které našel Mgr. Ondřej Gahura ve své diplomové práci. Druhá skupina obsahuje geny, jejichž proteinové produkty jsou komponentami sestřihového komplexu NTC (viz. kap. 2.3.3, Literární úvod). Poslední třetí skupinu tvoří některé faktory, které se účastní druhého sestřihového kroku.

skupina I. (syntheticky lethální partneři *prp45(1-169)*; Gahura *et al.*, přijato do tisku):

- YEp13-#3-7 (**SYF3**)¹⁹(*LEU2*, *amp^R*, 2μ)
- pSE358-**SLU7**²⁰(*TRP1*, *amp^R*, cen; Schwer)
YEp13-#2-8 (**SLU7**)¹⁹(*LEU2*, *amp^R*, 2μ)
- pDBY419-**PRP17**²⁰(*TRP1*, *amp^R*, cen; Kupiec)
- pSE358-**PRP22**²⁰(*TRP1*, *amp^R*, cen; Schwer)
- pRS414-**CEF1**²⁰(*TRP1*, *amp^R*, cen; Guthrie)

skupina II. (komplex NTC):

- pGBT9-**SNT309**²⁰(*TRP1*, *amp^R*, cen; Gould)
- pGAD424-**SYF1**(*LEU2*, *amp^R*, 2μ; Gould)
- pGAD424-**CWC2**(*LEU2*, *amp^R*, 2μ; Gould)
- pGAD424-**PRP19**(*LEU2*, *amp^R*, 2μ; Gould)
- pGAD424-**PRP46**(*LEU2*, *amp^R*, 2μ; Gould)

¹⁹ Plazmidy YEp13-#2-8 a YEp13-#3-7 obsahují fragmenty genomové knihovny s geny *SLU7* a *SYF3*, které byly nalezeny Mgr. Ondřejem Gahurou (Gahura *et al.*, v přípravě). Pro transformaci mutantních klonů odvozených od kmene FPY4B byl použit plazmid YEp13-#2-8, který obsahuje i nejbližší 5' a 3' okolí přítomného genu. U klonů pocházejících od kmene AVY11 byl zvolen vhodnější plazmid pSE358-SLU7.

²⁰ Plazmidy nesoucí gen *TRP1* jako selekční marker nebylo možné použít k transformaci mutantních klonů odvozených od kmene FPY4B, protože kmen je k tryptofanu prototrofní.

skupina III. (sestříhové faktory druhého kroku):

- pMK5-8-**PRP8**²¹(*HIS3*, *amp*^R, 2μ typ; Konarska)
- pSE358-**PRP16**²⁰(*TRP1*, *amp*^R, cen. typ, Guthrie)
- pAS2.1-**PRP18**²⁰(*TRP1*, *amp*^R, cen. typ; Kupiec)

4.7.1.1 Transformace plazmidy skupiny I.

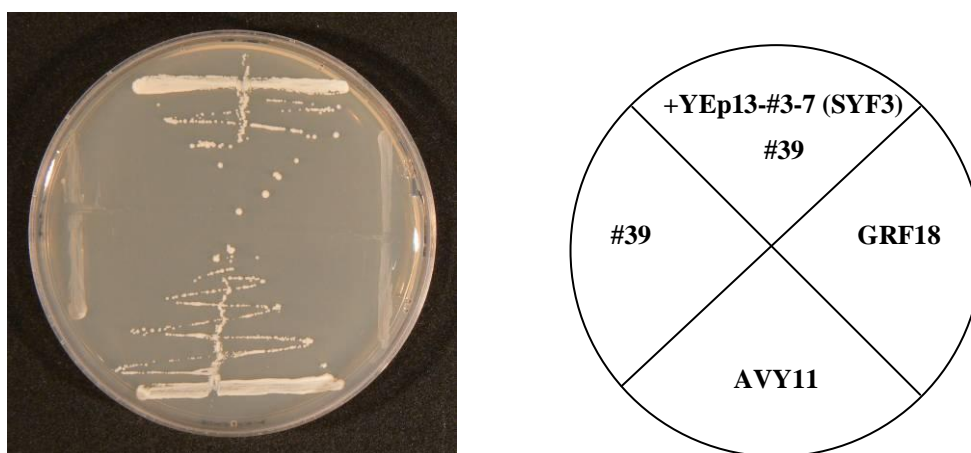
Synthetická lethality s *prp45(1-169)* byla v předešlé kapitole prokázána celkem u 37 mutantních klonů. Ondřej Gahura ve své diplomové práci připravil mutantní klony FPY4B #2 a #3 a posléze identifikoval geny *SLU7* a *SYF3*, jejichž mutace jsou syntheticky lethální s *prp45(1-169)*. Na základě komplementačních skupin byla v této práci nalezena dvojice klonů #3 a #39, které obsahují mutaci v totožném genu (viz. kap. 4.4). Po transformaci plazmidem YEp13-#3-7 (*SYF3*) byla synthetická lethality potvrzena i u klonu AVY11 #39 (viz. obr. 4.19).

Všech 34 mutantních klonů, které nesou mutace v neznámém genu, bylo transformováno první skupinou plazmidů. Gen *SLU7* byl schopen suprimovat syntheticky lethální stav klonu #16, který je odvozen od kmene FPY4B (viz. obr. 4.20). Mgr. Ondřej Gahura identifikoval u klonu FPY4B #2 jako syntheticky lethálního partnera mutaci v genu *SLU7*, ale protože oba klony, #16 a #2, jsou odvozeny od stejného kmene, nebylo možné je nalézt prostřednictvím komplementačních skupin. Klon FPY4B #16 patří do skupiny klonů s „podivným“ fenotypovým projevem, který vzniká po transformaci plazmidem YEp13-PRP45 (viz. kap. 4.5.1). Zcela stejný projev nastává i po transformaci tohoto klonu plazmidem YEp13-#2-8 (*SLU7*). Na selekčním médiu vyrůstají opět drobnější celobílé kolonie a „standardně“ rostoucí kolonie červené barvy s velice slabými bílými sektory při okrajích.

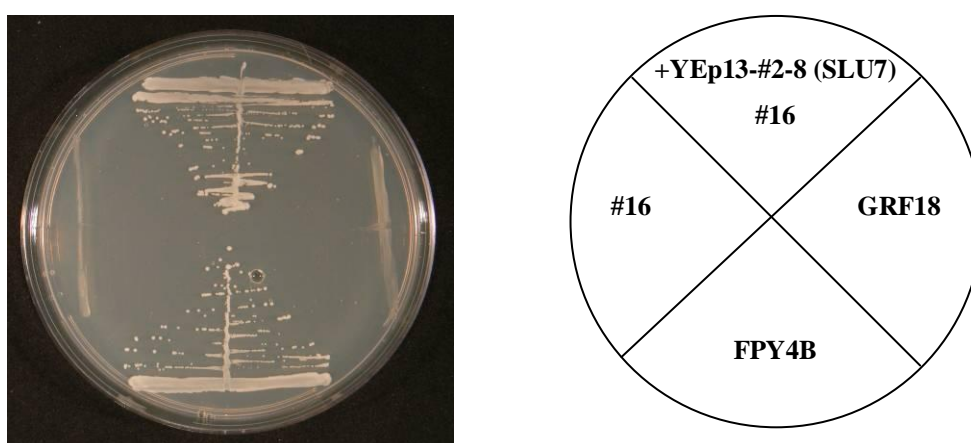
²¹ V případě plazmidu pMK5-8-PRP8, který obsahuje jako selekční marker gen *HIS3*, nebylo možné pozorovat případnou ztrátu plazmidu POG02, neboť oba kmeny, AVY11 i FPY4B, jsou genetického charakteru *ade3* a *his3*. Proto bylo po transformaci přistoupeno k selekci růstu buněk na médiu s 5-FOA (přítomen histidin i adenin v médiu).

Dále se podařilo identifikovat tři klony odvozené od kmene AVY11 adekvátně reagující na plazmid, který nese divokou alelu genu *PRP22*, AVY11 #28, #30 a #38 (viz. obr. 4.21). Posledním genem s pozitivním nálezem byl *CEF1*, klon AVY11 #22 (viz. obr. 4.22).

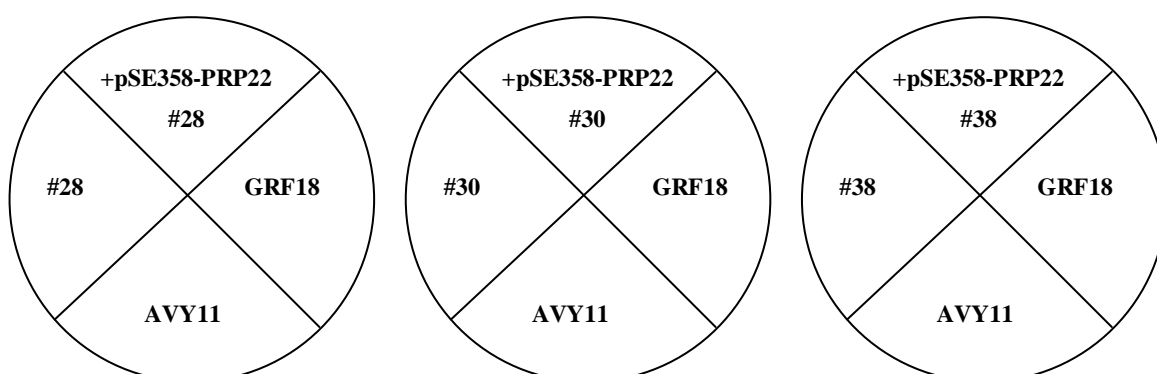
Celkem bylo po transformaci plazmidy první skupiny identifikováno šest klonů, u nichž byla prokázána syntetická lethality mezi *prp45(1-169)* a mutací v genech *SYF3* (AVY11 #39), *SLU7* (FPY4B #16), *PRP22* (AVY11 #28, #30 a #38) a *CEF1* (AVY11 #22).



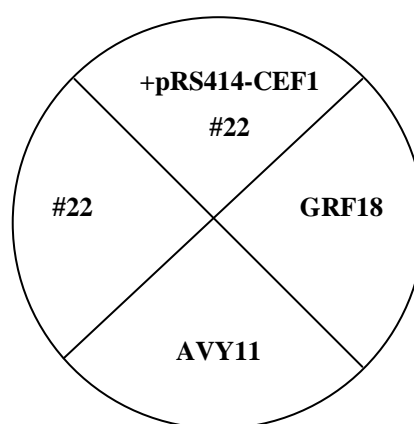
Obr. 4.19. Klon #39 odvozený od kmene AVY11 po transformaci plazmidem s divokou alelou genu *SYF3* je schopen růst na médiu s 5-FOA.



Obr. 4.20. Klon FPY4B #16 po transformaci plazmidem YEp13-#2-8 (SLU7) je schopen růst na médiu s 5-FOA.



Obr. 4.21. Test růstu buněk klonů #28, #30 a #38 odvozených od kmene AVY11 transformovaných plazmidem pSE358-PRP22 na médiu obsahujícím 5-FOA.

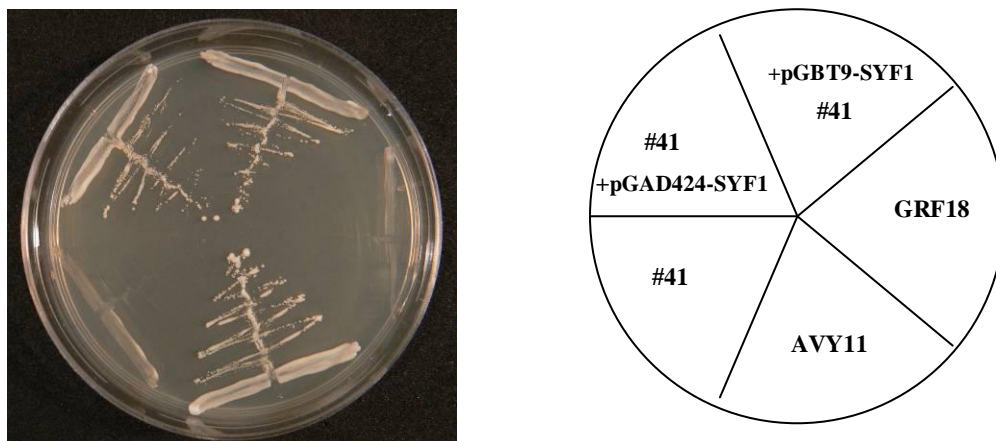


Obr. 4.22. U klonu AVY11 #22 byla potvrzena syntetická lethality s mutací v genu *CEF1*. Buňky transformované pRS414-CEF1 ztrácí pOG02, což jim umožňuje růst na médiu s 5-FOA.

4.7.1.2 Skupina II-proteiny komplexu NTC

S proteinem Prp19 asociovaný komplex (NTC) se účastní sestřihu pre-mRNA. K dispozici jsme měli sérii pěti genů na plazmidech určených pro dvouhybridní analýzu, tedy vybrané geny byly fúzovány s DNA vazebnou (pGBT9) nebo aktivační doménou (pGAD424). Pro testování případného vztahu syntetické lethality byla zvolena série s aktivační doménou, neboť plazmidy obsahují gen *LEU2*. V případě genu *SNT309* jsme měli k dispozici pouze plazmid pGBT9-SNT309, který nese jako selekční marker gen *TRP1*, proto v tomto případě bylo možné transformovat mutantní klony odvozené pouze od kmene AVY11.

Po transformaci plazmidy obsahujícími pět vybraných genů komplexu NTC, *SNT309*, *SYF1*, *CWC2*, *PRP19* a *PRP46*, byl nalezen klon AVY11 #41 vykazující syntetickou lethality mezi mutací v genu *SYF1* a *prp45(1-169)*, viz. obr. 4.23.

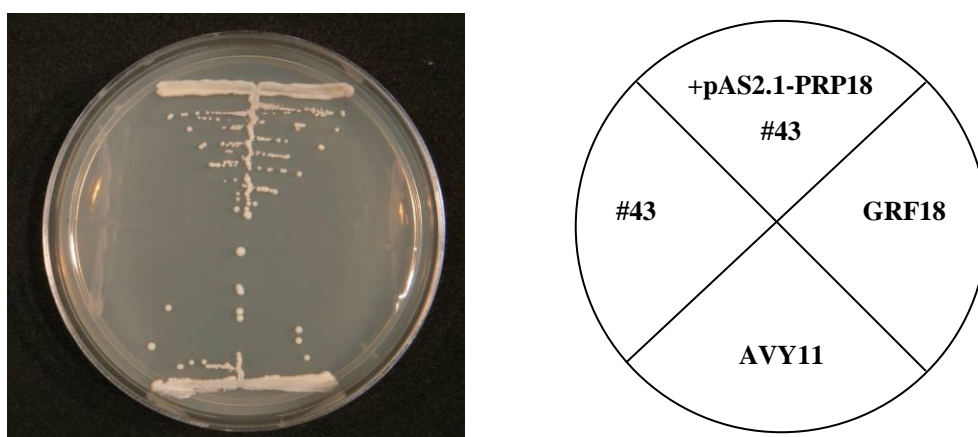


Obr. 4.23. Klon AVY11 #41 transformovaný plazmidem pGBT9-SYF1 a pGAD424-SYF1 je schopen růst na médiu obsahujícím 5-FOA.

4.7.1.3 Faktory podílející se na druhém kroku sestřihu, skupina III.

Do poslední skupiny testovaných plazmidů byly zařazeny tři geny, *PRP8*, *PRP16* a *PRP18*. Z předchozího kroku zbývalo 30 neidentifikovaných klonů, které byly posléze podrobeny transformaci plazmidy poslední, tedy třetí skupiny.

Na základě transformace pAS2.1-*PRP18* (gen *PRP18* je fúzován s DNA vazebnou doménou, plazmid konstruovaný pro dvouhybridní testování) byl nalezen klon AVY11 #43, jenž vykazuje genetický vztah s *PRP18*. Výsledek růstu na médiu s 5-FOA zobrazuje obr. 4.24.



Obr. 4.24. Klon AVY11 #43 vykazuje genetický vztah mezi *PRP18* a *PRP45*, médium s 5-FOA.

Celkem bylo po přímém testování třinácti plazmidy, které nesou vybrané geny, identifikováno z 35 mutantních klonů celkem osm, jež obsahuje syntheticky lethální mutace v genech *SYF3* (AVY11 #39), *SLU7* (FPY4B #16), *PRP22* (AVY11 #28, #30 a #38), *CEF1* (AVY11 #22), *SYF1* (AVY11 #41) a *PRP18* (AVY11 #43).

Vzhledem ke skutečnosti, že možnosti transformace plazmidy s geny *PRP17*, *PRP22*, *CEF1*, *SNT309*, *PRP16* a *PRP18* jsou omezeny pouze na mutantní klony odvozené od kmene AVY11, nelze vyloučit přítomnost mutací v genech *PRP17*, *SNT309* a *PRP16* u zbylých klonů pocházejících od kmene FPY4B. Pro ostatní jmenované geny, *PRP22*, *CEF1* a *PRP18*, byly nalezeny mutantní klony vytvořené od kmene AVY11, ale žádný z nich není představitelem komplementační skupiny o více než jediném zástupci.

4.7.2 Transformace genomovou knihovnou

Z původních 37 mutantních klonů zbývalo po přímém testování plazmidy 27 klonů s mutacemi v neznámých genech. Klony FPY4B #1 a AVY11 #23, #26, #31, #33, #34, #36 a #45 byly vybrány jako vhodní kandidáti pro transformaci genomovou knihovnou. Výběr probíhal na základě fenotypového projevu po transformaci jiným plazmidem nesoucím *PRP45* (YEp13-PRP45), viz. kap. 4.5.1. Transformace genomovou knihovnou byla provedena u dvou klonů. První, AVY11 #31, má komplementačního partnera odvozeného od kmene FPY4B, skupina o dvou zástupcích #7 a #31. Druhým vybraným klonem byl AVY11 #36.

4.7.2.1 Transformace genomovou knihovnou klonů #31 a #36

Transformace klonů AVY11 #31 a #36 genomovou knihovnou klonovanou do vektoru YEp13 (*LEU2*, *amp^R*, 2 μ ; Nasmyth a Tatchell, 1980) proběhla upravenou LiAc metodou adaptovanou pro transformaci velkého objemu kultury buněk. Selektce transformovaných buněk byla založena na schopnosti růstu na minimálním SD médiu bez aminokyseliny leucin. Celkem bylo získáno přibližně 90 tis. transformovaných kolonií u klonu #31 a 70 tis. u klonu #36.

Po transformaci byly vybírány sektorující a bílé kolonie, které mohou vznikat vlivem tří možných faktorů. Buňky závislé na plazmidu pOG02 s divokou alelou genu *PRP45* mohly získat fragment genomové knihovny s genem *PRP45*. Vzhledem k probíhající selekci na přítomnost plazmidu YEp13-library dojde ke ztrátě plazmidu pOG02 v rostoucí populaci buněk během následných mitotických dělení. Vzájemná výměna dvou plazmidů s *PRP45* se projeví tvorbou bílých sektorů na původně červených koloniích, schopností růstu na médiu s 5-FOA a odolností k restriktivní teplotě 37°C, pokud ovšem není příslušný klon citlivý k testované teplotě v důsledku mutace generované ozařováním (viz. kap. 4.3.1).

Druhou možností představuje přítomnost genu *ADE2*. Plazmid pOG02 obsahuje funkční gen *ADE3* a po transformaci genem *ADE2* dochází k obnovení biosynthetické dráhy pro vznik adeninu a dalších purinů a ztrátě červeného zabarvení kolonií. U buněk stále přetrvává závislost na plazmidu pOG02 a s tím spojená neschopnost růstu na médiu s 5-FOA. Kultura je schopná růst ve 37°C a vykazuje prototrofii k adeninu.

Poslední alternativou je transformace plazmidem s úsekem chromosomální DNA, který obsahuje divokou verzi genu, u něhož došlo při náhodné mutagenezi k zásahu do jeho genomové varianty. Po ztrátě plazmidu pOG02 kolonie sektorují, bělají a jsou schopné růst na médiu s 5-FOA. Testované buňky vykazují citlivost ke kultivační teplotě 37°C a prostřednictvím PCR nelze u nich detekovat divokou alelu *PRP45*.

Identifikace kolonií s genem *ADE2*, test růstu na médiu s 5-FOA

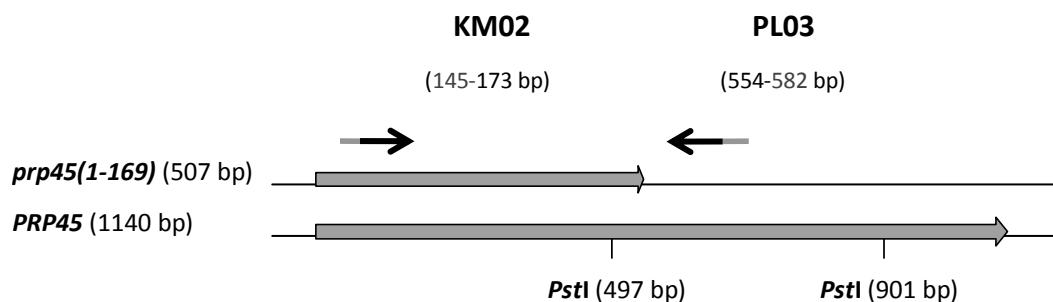
U klonu AVY11 #31 bylo nalezeno zhruba 50 bílých či sektorujících kolonií. Růstu na médiu s 5-FOA bylo schopno 43 kolonií.

V případě klonu AVY11 #36 bylo získáno kolem 120 kolonií s bílým zabarvením nebo vykazujících tvorbu sektorů. Prostřednictvím schopnosti růstu na médiu s 5-FOA bylo identifikováno celkem 57 kolonií.

Vyloučení divoké alely *PRP45*, test růstu v restriktivní teplotě 37°C a detekce *PRP45* na základě PCR

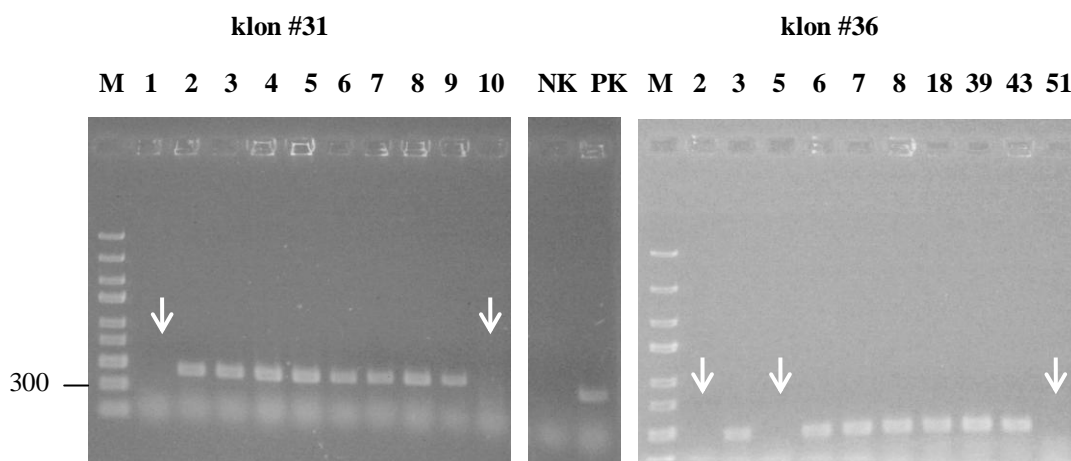
Oba klony, AVY11 #31 i #36, dle testu provedeného v kap. 4.3.1 nevykazují citlivost ke zvýšené kultivační teplotě 37°C (u klonu #31 byla nalezena částečná sensitivita). Gen *PRP45* nesený jak na plazmidu pOG02 tak také na YEp13-*PRP45* je schopen zajistit odolnost buněk kmene AVY11 i FPY4B s mutací *prp45(1-169)* k uvedené restriktivní teplotě (viz. kap. 4.1.2). Získané kolonie (klon #31 celkem 43 kolonií a klon #36 kolonií 57) byly podrobeny schopnosti růstu ve 37°C. Citlivost ke zvýšené kultivační teplotě byla potvrzena pro dvě kolonie u klonu #31, #31-1 a #31-10, u klonu #36 nebyly schopny růst kolonie tři, #36-2, #36-5 a #36-51.

Nepřítomnost divoké alely *PRP45* byla také ověřena PCR (program OG03, primery KM02 a PL03. Buňky byly před přidáním reakční směsi vystaveny teplotě 95°C po dobu 3 min. a poté ochlazeny na ledu. PCR detekuje pouze divokou variantu, neboť jeden ze zvolených primerů, PL03, je komplementární k oblasti genu *PRP45* nepřítomné u zkrácené varianty, *prp45(1-169)*, viz. obr. 4.25. Celkem bylo od každého z klonů testováno deset kolonií (kromě citlivých kolonií k 37°C byly náhodně vybrány další do konečného počtu deseti). Výsledek zobrazuje obr. 4.26, divoká alela *PRP45* nebyla identifikovat jen u kolonií označených #31-1, #31-10 a #36-2, #36-5, #36-51. Získané nálezy tedy odpovídají dříve provedenému testu na růstovou citlivost buněk k teplotě 37°C.



Obr. 4.25. Schematické znázornění nasedání primerů na templátovou DNA.

Zkrácená varianta genu *prp45(1-169)* neobsahuje cílové místo rozeznávané primerem PL03. Šedě jsou označeny 12 nukleotidů dlouhé nástavce primerů, které nejsou komplementární s cílovou DNA. Požadovaný produkt PCR dosahuje délky 438 bp. Vyznačena jsou dvě *PstI* restrikční místa, která dávají vznik charakteristickému 404 nukleotidů dlouhému fragmentu u divoké alely *PRP45*.



Obr. 4.26. Prostřednictvím PCR z kolonií *S. cerevisiae* byla testována přítomnost genu *PRP45* na plazmidu YEp13-library.

Pozitivní kontrola byla zastoupena kmenem AVY11 transformovaným plazmidem YEp13-PRP45, negativní kontrola byla provedena z buněk kmene AVY11. Vlevo jsou zobrazeny produkty PCR od klonu AVY11 #31, vpravo klonu AVY11 #36 (číselné značení odpovídá popisům získaných kolonií od každého z klonů). Produkty PCR byly elektroforeticky analyzovány na 1% agaróze v TAE, linie na gelu, které postrádají produkt délky 438 bp, jsou zvýrazněny šipkou.

M velikostní marker GeneRuler™ Express DNA Ladder (#SM1553; MBI Fermentas, Litva)

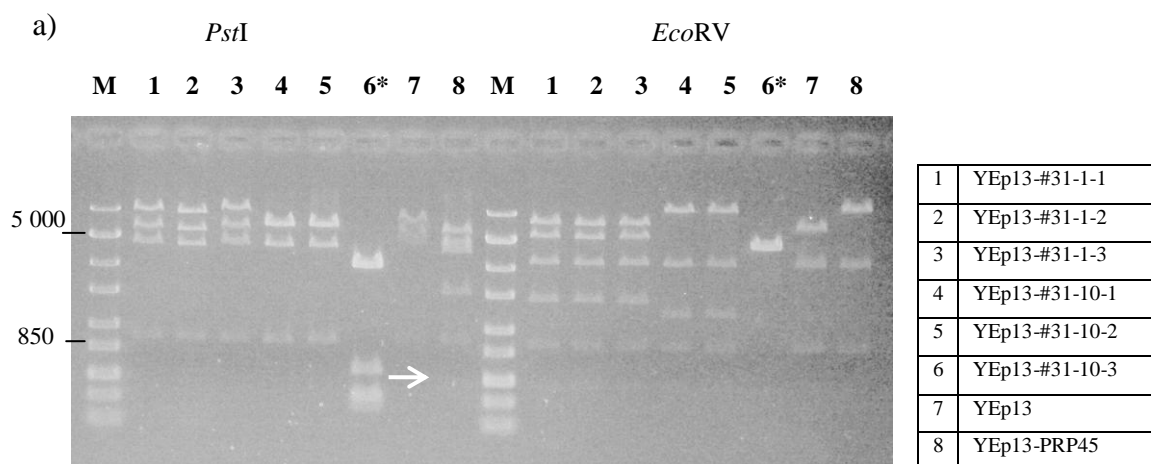
program OG03:

1. 94°C 1 min
2. 93°C 20 s
3. 40°C 30 s
4. 72°C 30 s
5. 2krát opakovat kroky 2 až 4²²
6. 93°C 20 s
7. 55°C 30 s
8. 72°C 30 s
9. 27krát opakovat kroky 6 až 8
10. 72°C 5 min
11. 10°C 30 s
12. konec

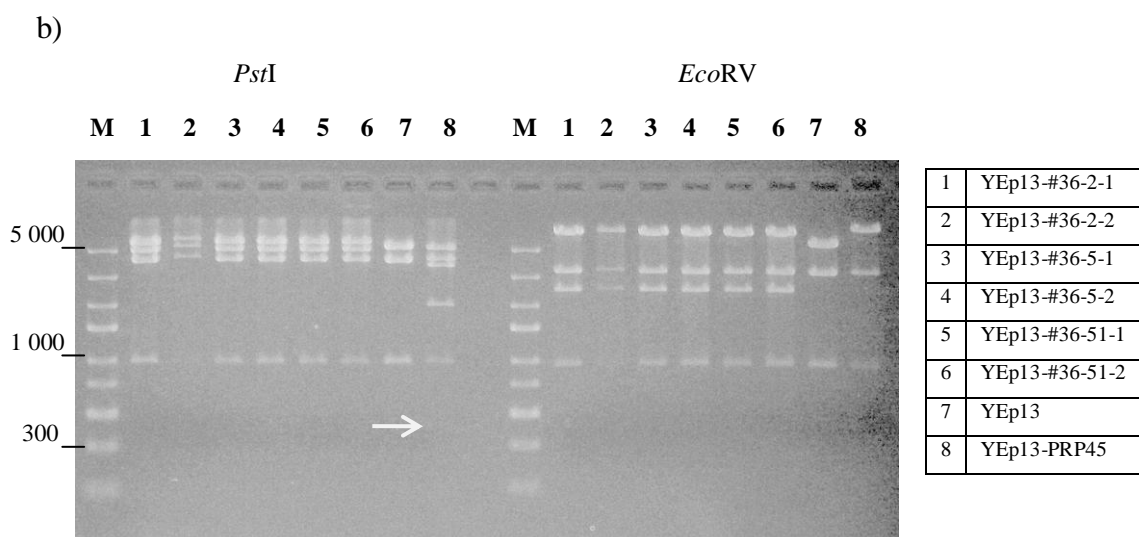
Z pozitivních kolonií *S. cerevisiae* na nepřítomnost *PRP45* byla izolována plazmidová DNA fenol-chloroformovou extrakcí s využitím skleněných kuliček. Izoláty byly čištěny pomocí komerční soupravy NucleoSpin® Plasmid a poté transformovány elektroporací do kompetentních buněk DH5α *E. coli*. Plazmidy izolované z *E. coli* byly podrobeny restričnímu štěpení enzymy *PstI* a *EcoRV*. Divoká alela genu *PRP45* obsahuje dvě restriční místa pro štěpení *PstI* a generuje tak charakteristický fragment délky 404 bp (viz. obr. 4.25). Druhý enzym, *EcoRV*, byl zvolen, neboť místo jím rozeznávané je nahodile rozmístěno v genomové DNA *S. cerevisiae*.

Nález restričního fragmentu *PstI-PstI* délky 404 bp byl učiněn pouze u pozitivní kontroly, plazmidu YEP13-PRP45, u žádného z dvanácti testovaných plazmidů nebyl identifikován (viz. obr. 4.27). Restriční štěpení enzymy *PstI* a *EcoRV* prokázalo přítomnost identického fragmentu genomové knihovny v plazmidu YEp13 u kolonií klonu #36 (#36-2, #36-5 a #36-51). V případě klonu #31 (kolonie #31-1 a #31-10) nebyly analyzovány shodné fragmenty (vyjma úseků pocházejících z vektoru YEp13). Nelze tedy určit, zda se jedná o dva různé geny, nebo jen o odlišné úseky téhož lokusu.

²² Během prvních tří cyklů PCR probíhala fáze nasedání primerů při nižší teplotě pro neúplnou komplementaritu primerů KM02 a PL03.



M velikostní marker ZipRuler™ Express DNA Ladder Set, 1 (#SM1378; MBI Fermentas, Litva)



M velikostní marker GeneRuler™ Express DNA Ladder (#SM1553; MBI Fermentas, Litva)

Obr. 4.27. Restrikční ověření plazmidů získaných z kolonií #31-1 a #31-10, obr. a), a kolonií #36-2, #36-5 a #36-51, obr. b).

U klonu #31 byly izolovány plazmidy vždy ze tří kolonií *E.coli* transformovaných totožným izolátem, v případě klonu #36 byla provedena izolace ze dvou kolonií pro každý z plazmidů. Šipka označuje 404 bp dlouhý restrikční fragment *PstI*-*PstI* charakterizující *PRP45*. * je označen nežádoucí plazmid, který představuje kontaminaci nebo vznikl rekombinantní úpravou původního plazmidu.

Analyzováno na 1,5 % agarózovém gelu v TAE.

Předpokládané restrikční fragmenty **YEp13-library**²³:

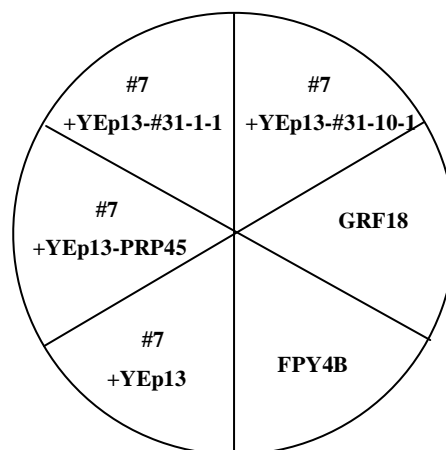
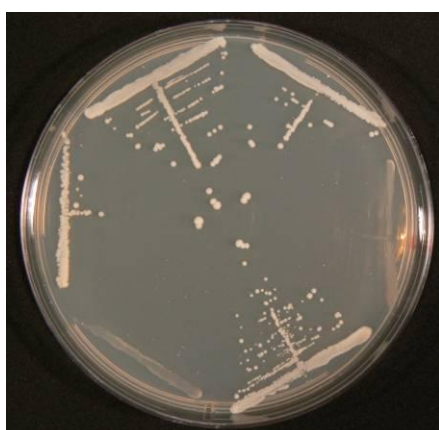
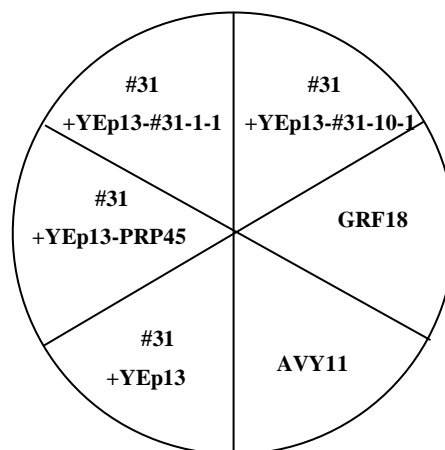
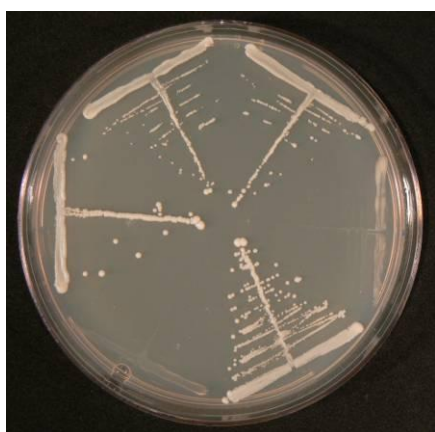
***PstI*: 997, 4066 a 5604** (+úsek genomové knihovny) bp

***EcoRV*: 961, 3304 a 6402** (+úsek genomové knihovny) bp

²³ Tučně jsou zvýrazněny restrikční fragmenty charakteristické pro vektor YEp13.

4.7.2.2 Zpětná transformace klonu AVY11 #31 plazmidy YEp13-#31-1-1 a YEp13-#31-10-1; potvrzení synthetické lethality

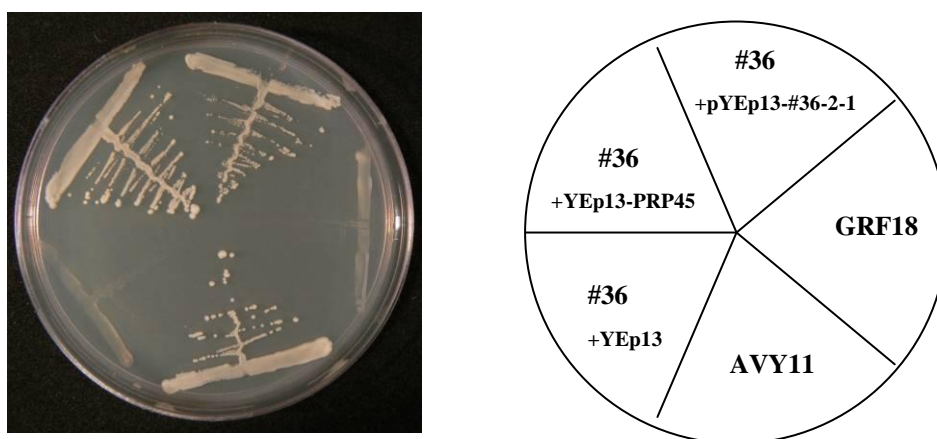
Klon AVY11 #31 byl transformován vektorem YEp13 a plazmidy YEp13-#31-1-1, YEp13-#31-10-1 a YEp13-PRP45. Ve všech případech byla pozorována tvorba sektorujících kolonií nebo vyrůstaly bílé kolonie (kromě transformace vektorem). Získané plazmidy obsahují gen, jehož mutovaná genomová varianta je ve vztahu synthetické lethality s *prp45(1-169)*. Klon AVY11 #31 tvoří komplementační skupinu s klonem FPY4B #7 (viz. kap. 4.4). I v případě tohoto klonu byla synthetická lethality testovanými plazmidy, YEp13-#31-1-1 a YEp13-#31-10-1, suprimována. Následný test schopnosti růstu na médiu s 5-FOA potvrdil vztah genetické interakce (viz. obr. 4.28).



Obr. 4.28. Klony AVY11 #31(nahoře) a FPY4B #7(dole) transformované plazmidy s fragmenty genomové knihovny YEp13-#31-1-1 a YEp13-#31-10-1 jsou schopné růst na médiu s 5-FOA.

4.7.2.3 Transformace klonu #36 plazmidem YEp13-#36-2-1, který obsahuje neznámý fragment genomové knihovny

Klon AVY11 #36 byl transformován plazmidy YEp13-#36-2-1, YEp13-PRP45 a vektorem YEp13. Získané kolonie vykazovaly přítomnost bílých sektorů. Test schopnosti růstu na médiu s 5-FOA potvrdil, že plazmid YEp13-#36-2-1 nese gen suprimující syntetickou lethality (viz. obr. 4.29).



Obr. 4.29. Klon AVY11 #36 transformovaný plazmidem YEp13-#36-2-1 je schopen ztratit původní plazmid pOG02 a růst na médiu s 5-FOA.

4.7.2.4 Identifikace neznámého genu zodpovědného za stav synthetické lethality u klonu AVY11 #31

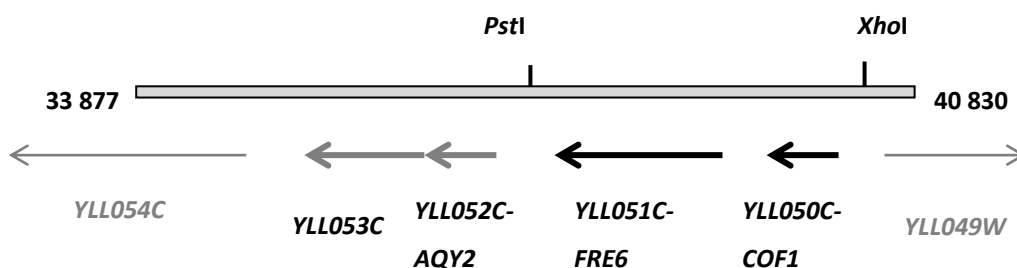
Získané plazmidy, YEp13-#31-1-1 a YEp13-#31-10-1, prokazatelně nesou gen, jehož mutantní genomová alela je ve vztahu synthetické lethality s *prp45(1-169)*. Plazmidy byly čištěny NucleoSpin® Plasmid a podrobeny sekvenaci obou konců vloženého fragmentu (Agowa, SRN; www.agowa.de/index.html), použité primery BR-B1 a P1.

a) **YEp13-#31-1-1** (označení AV-1, celková délka fragmentu 8 499 bp)

= chromosom XII: 33 879 (AV-1-P1)-42 378 bp (AV-1-BR-B1)

b) **YEp13-#31-10-1** (označení AV-2, celková délka fragmentu 6 953 bp)

= chromosom XII: 33 877 (AV-2-BR-B1)-40 830 bp (AV-2-P1)



Obr. 4.30. Schematické znázornění úseku chromosomu XII délky 6 953 bp, který se nachází na plazmidu YEp13-#31-10-1 (AV-2).

Geny *YLL054C* a *YLL049W* (slabě šedivě označení) nejsou obsaženy celé na fragmentu AV-2. Černě jsou zvýrazněny geny *FRE6* a *COF1*, které představují nejpravděpodobnější genetické interakční partnery *PRP45*. Restrikční místa *PstI* a *XhoI* byla použita ke klonování úseku s geny *FRE6* a *COF1*.

Oba plazmidy obsahují překrývající se fragmenty chromosomu XII. Pro přiřazení získané sekvence genomové knihovny k příslušnému úseku chromosomální DNA byla využita databáze *S. cerevisiae* (www.yeastgenome.org) a program WU-BLAST2 (www.seq.yeastgenome.org/cgi-bin/blast-sgd.pl).

Pro další práci byl používán plazmid YEp13-#31-10-1 (AV-2), protože obsahuje překryvný úsek obou získaných částí chromosomu XII. Celkem se zde nachází čtyři celé geny a dva geny neúplně (přítomny promotorové oblasti a počáteční úseky ORF). Oba částečně přítomné geny byly z analýz vyřazeny.

Stručná charakteristika potenciálních genů:

(převzato z Saccharomyces Genome Database, www.yeastgenome.org)

- ***YLL053C***

Gen neznámé funkce, u kmene *S. cerevisiae* Sigma 1278B je tento gen pokračováním předešlého genu, *AQY2* (*YLL052C*).

- ***AQY2* (*YLL052C*)**

Protein Aqy2 vytváří vodní kanál v buněčné membráně, který zajišťuje transport vody. Exprese je řízena osmotickými signály a probíhá pouze u dělících se kvasinek. Možná úloha při toleranci kvasinek k chladu. U většiny kmenů *S. cerevisiae* je gen přerušen stop kodónem.

- ***FRE6* (*YLL051C*)**

Potenciální reduktáza železa s vysokou mírou podobnosti s Fre2p (reduktáza pro železo a měď), exprese je řízena nízkou hladinou železa.

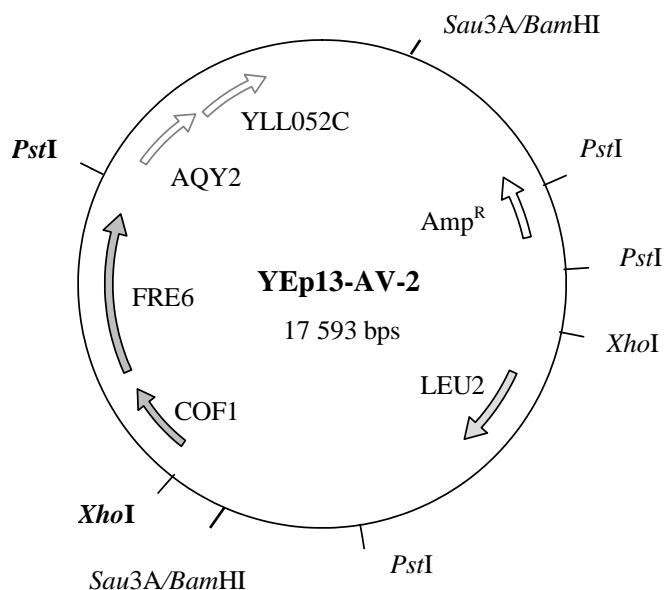
- ***COF1* (*YLL050C*)**

Cofilín je esenciální protein všudypřítomného výskytu a jeho aktivita je řízena fosforylací. V závislosti na změně pH reguluje depolymeraci aktinového cytoskeletu. Gen *COF1* obsahuje intron.

Mezi kandidátní geny zodpovědné za stav syntetické lethality byly vybrány *FRE6* a *COF1*. Pro ověření a určení správného genu bylo nezbytné oba geny zvlášť klonovat a testovat. Oddělení genů, *COF1* a *FRE6*, s využitím vhodných restrikčních míst nebylo možné, proto byla zvolena alternativa klonování celého úseku s oběma geny přes restrikční místa *Pst*I a *Xho*I (viz. obr. 4.31). Vytvořeným plazmidem s geny *COF1* a *FRE6* byly buňky klonu AVY11 #31 transformovány pro potvrzení vztahu s jedním z dvojice genů a tedy i vyloučením zbývajících dvou, *YLL053C* a *AQY2*.

4.7.2.4.1 Příprava plazmidu pAV04 (pRS315-FRE6 a COF1)

Restrikčními endonukleázami, *Pst*I a *Xho*I, byl štěpen plazmid YEp13-AV-2 (YEp13-#31-10-1) a fragment s geny *COF1* a *FRE6* délky 3663 bp byl klonován přes identická restrikční místa do vektoru pRS315 (*LEU2*, *amp^R*, *cen*). Získaný plazmid byl restrikčně ověřen a pozitivní výsledek zobrazuje obr. 4.32. Vytvořený plazmid byl pojmenován pAV04.



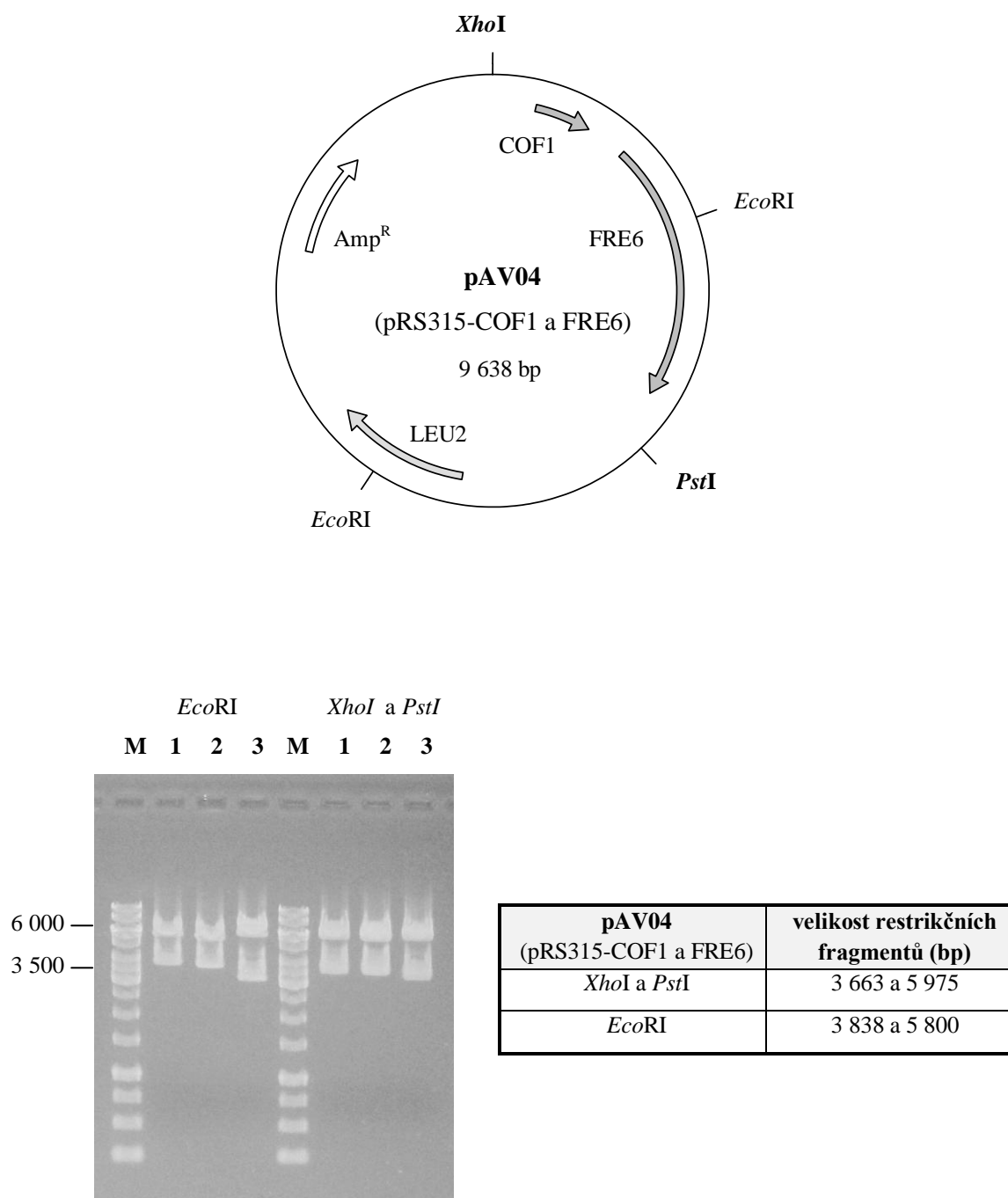
Obr. 4.31. Schematické znázornění plazmidu YEp13-AV-2 (YEp13-#31-10-1), který obsahuje 6 953 nukleotidů dlouhý fragment genomové knihovny se čtyřmi geny.

Při štěpení enzymy *XhoI* a *PstI* vzniká šest fragmentů délky 719, 997, 2499, 3663, 3389 a 6326 bp. Úsek velikosti 3663 nukleotidů nese geny *COF1* a *FRE6*. Genomová knihovna byla připravena štěpením restriční endonukleázou *Sau3A* a klonována do vektoru YEp13 přes restriční místo *BamHI* (Nasmyth a Tatchell, 1980).

Buňky klonu AVY11 #31 transformované plazmidem pAV04 byly selektovány na minimálním SD médiu bez aminokyseliny leucin. Narostlé kolonie vykazovaly přítomnost sektorů, vztah syntetické lethality s jedním z dvojice genů byl prokázán i růstem na médiu s 5-FOA, shrnuto v obr. 4.35.

4.7.2.4.2 Ověření syntetické lethality mezi geny *PRP45* a *COF1*, příprava plazmidu pAV06 (pRS315-COF1)

Z dvojice genů *COF1* a *FRE6* byl přednostně vybrán *COF1*. Příprava plazmidu nesoucího gen *COF1* byla provedena klonováním s využitím PCR amplifikující úsek z plazmidu YEp13-AV-2 (YEp13-#31-10-1). Byly navrženy primery AV11 a AV12 a výsledný produkt pokrýval dostatečně dlouhou oblast pro zajištění přítomnosti promotorové, regulační a terminační oblasti genu *COF1* (srovnáno s *Saccharomyces* Genome Database, www.yeastgenome.org). Celková délka klonovaného fragmentu činila 1194 bp, ORF (s intronem) dosahuje 611 bp. Použita byla Expand High Fidelity polymeráza generující menší počet chyb při polymeraci (Roche-Boehringer Mannheim, BRD). Produkt PCR byl vložen do vektoru pCR 2.1 TOPO (*LacZ*, *kan^R*, *amp^R*) s využitím soupravy TOPO TA Cloning Kit.



Obr. 4.32. Restrikční ověření a mapa plazmidu pAV04 (pRS315-COF1 a FRE6).

Izolace plazmidové DNA byla provedena ze tří kolonií *E. coli* (na gelu značeno 1, 2 a 3). Vpravo je zobrazeno restrikční ověření enzymy *PstI* a *XhoI*, které byly použity pro klonování fragmentu s geny *COF1* a *FRE6*. Místo rozeznávané restrikčním enzymem *EcoRI* je přítomno jak ve vneseném fragmentu, tak také v původním vektoru pRS315 (zobrazeno vlevo na gelu). Plazmid s označením 3 neodpovídá požadovanému restrikčního štěpení, plazmidy izolované z kolonií *E. coli*. 1 a 2 jsou správné. Použit 1% agarózový gel v TAE.

M velikostní marker GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (#SM0311; MBI Fermentas, Litva)

program AV06:

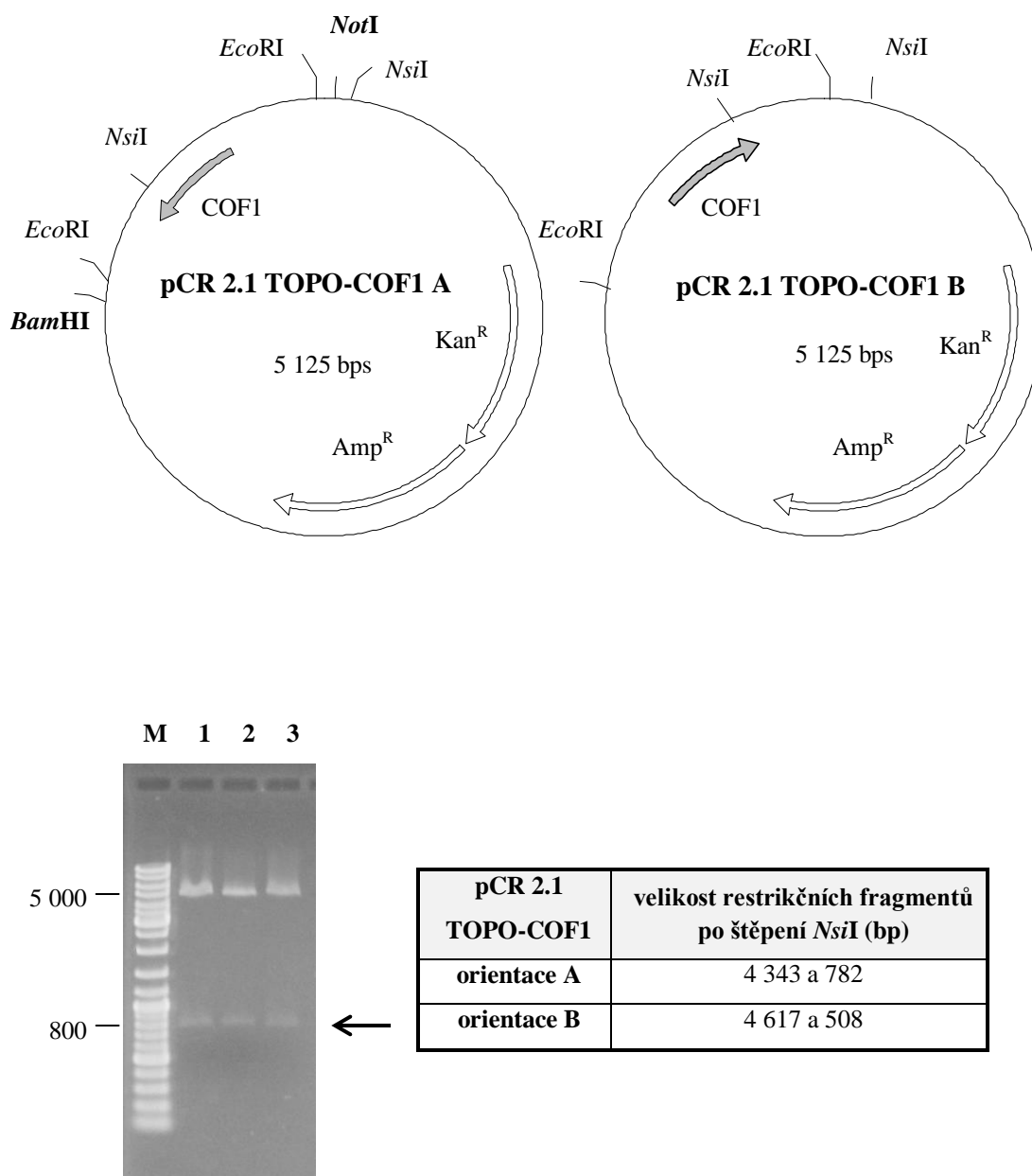
9. 95°C 2 min
10. 94°C 30 s
11. 48°C 30 s
12. 72°C 1 min
13. 24krát opakovat kroky 2 až 4
14. 72°C 5 min
15. 15°C 1 min
16. konec

Pro kontrolní ověření byla využita opět PCR provedená z buněčné kultury *E. coli*, která byla před přidáním reakční směsi vystavena teplotě 95°C pod dobu 3 min. a poté ochlazená na ledu. Přítomnost genu *COF1* byla analyzována s využitím primerů AV11 a AV12 a programu AV06. Celkem bylo testováno šest náhodně vybraných bílých kolonií *E.coli*. a produkt délky 1 194 bp byl identifikován u všech (data neuvedena). Izolovaný plazmid ze tří pozitivních kolonií *E. coli* byl posléze podroben restričnímu ověření endonukleázou *NsiI* (viz. obr. 4.33). Získaný plazmid byl shledán správným.

Pro klonování genu *COF1* z plazmidu pCR 2.1 TOPO-COF1 do vektoru pRS315 (*LEU2*, *amp^R*, *cen*) byla zvolena kombinace enzymů *Bam*HI a *Not*I. Fragment s *COF1* genem dosahuje velikosti 1270 bp. Izolovaný plazmid byl podroben restričnímu ověření, které potvrdilo jeho náležitost (viz. obr. 4.34). Nově připravený plazmid s genem *COF1* byl pojmenován pAV06, pRS315-COF1.

Klon AVY11 #31 byl transformován plazmidem pAV06 a selekce buněk proběhla na základě prototrofie k aminokyselině leucin. U narostlých kolonií byl pozorován vznik bílých sektorů na původně červených koloniích. Vztah syntetické lethality mezi *prp45(1-169)* a mutací v genu *COF1* byl potvrzen i schopností růstu buněk na médiu s 5-FOA (viz. obr. 4.35).

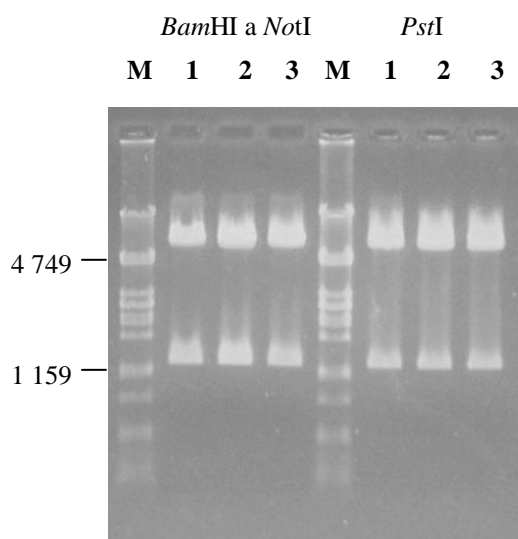
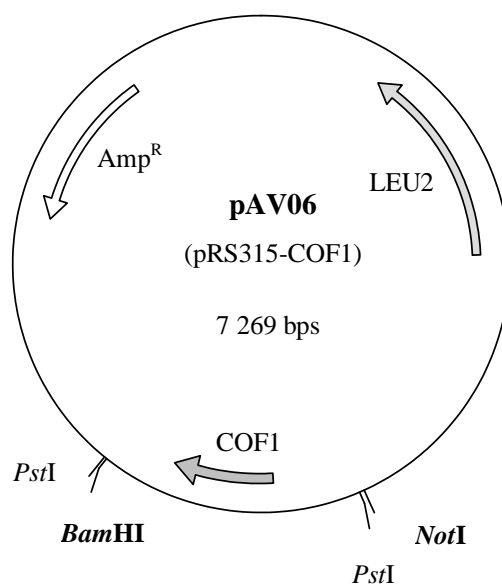
Plazmidem pAV04 (pRS315-FRE6 a *COF1*) a pAV06 (pRS315-COF1) byl transformován i partner z komplementační skupiny, klon FPY4B #7. I pro tento klon byla potvrzena syntetická lethality.



Obr. 4.33. Znázornění mapy plazmidu pCR 2.1 TOPO-COF1.

Restrikční ověření a určení orientace vloženého fragmentu s genem *COF1* s využitím enzymu *NsiI*. *EcoRI* místo na mapě plazmidu ohraničuje oblast vymezenou pro vkládání produktů PCR. Šipka označuje restrikční fragment délky 782 nukleotidů charakteristický pro orientaci A. Použit 1% agarózový gel v TAE.

M velikostní marker GeneRuler™ DNA Ladder Mix (#SM0331; MBI Fermentas, Litva)

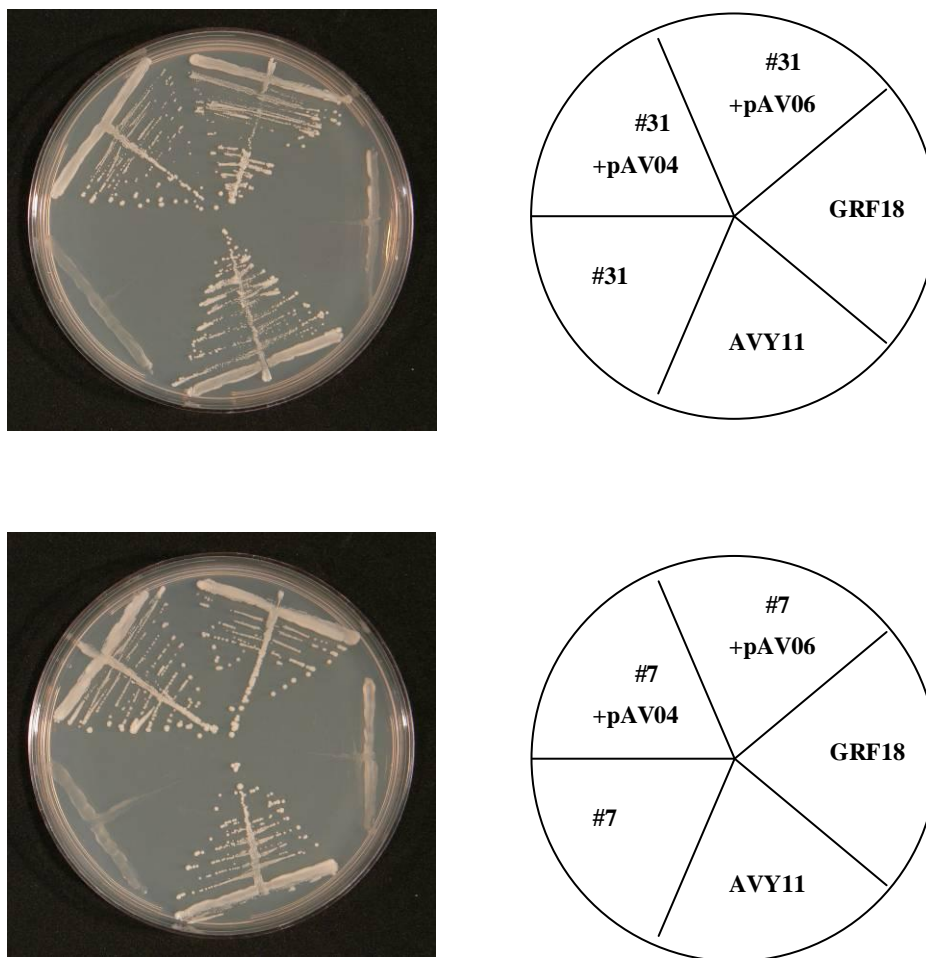


pAV06 (pRS315-COF1)	velikost restrikčních fragmentů (bp)
<i>Bam</i> HI a <i>Not</i> I	1 270 a 5 989
<i>Pst</i> I	1 260 a 6 009

Obr. 4.34. Restrikční ověření a mapa plazmidu pAV06 (pRS315-COF1).

Plazmidy byly izolovány ze tří kolonií *E. coli* (na gelu značeno 1, 2 a 3). Fragment s genem *COF1* byl klonová přes restrikční místa *Bam*HI a *Not*I (zobrazeno v levé části gelu), ověření správnosti plazmidu bylo provedeno i štěpením enzymem *Pst*I (vpravo). Analyzováno elektroforeticky na 1% agarózovém gelu v TAE.

M velikostní marker Lambda/*Pst*I



Obr. 4.35. Klony AVY11 #31 a FPY4B #7 transformované plazmidy pAV04 (pRS315-FRE6 a COF1) a pAV06 (pRS315-COF1) jsou schopné pozbýt plazmid pOG02 a růst na médiu s 5-FOA.

4.7.2.5 Určení genu synteticky lethálníhoho s *prp45(1-169)* u klonu AVY11 #36

Po transformaci klonu AVY11 #36 genomovou knihovnou YEp13-library byly získány nezávisle na sobě tři plazmidy obsahující dle restričního štěpení totožné úseky chromosomální DNA. Plazmid s označením YEp13-#36-2-1 byl čištěn soupravou NucleoSpin® Plasmid a krajní části vloženého fragmentu DNA genomové knihovny byly sekvenovány (primery BR-B1 a P1; Agowa, SRN, www.agowa.de/index.html). Cílová oblast byla identifikována srovnáním s databází *S. cerevisiae* (Saccharomyces Genome Database, www.yeastgenome.org) a využitím programu WU-BLAST2 (www.seq.yeastgenome.org/cgi-bin/blast-sgd.pl).

YEp13-#36-2-1 (označení AV-3, celková délka fragmentu 5 766 bp)

= chromosom II: 599 938 (AV-3-P1)-605 704 (AV-3-BR-B1)



Obr. 4.36. Schematické znázornění úseku 5 766 bp chromosomu II, který se nachází na plazmidu YEp13-AV-3 (YEp13-#36-2-1).

Gen *MBA1* (označen slabě šedivě) je zastoupen na fragmentu AV-3 pouze 16 nukleotidy, ostatní geny jsou přítomny celé. Černě je zvýrazněn kandidátní gen *NTC20*.

Na fragmentu genomové knihovny s označením AV-3 plazmidu YEp13-AV-3 (YEp13-#36-2-1) se nachází čtyři celé geny, nejpravděpodobnějším kandidátem je gen *NTC20*, sestřihový faktor a protein komplexu NTC.

Stručná charakteristika potenciálních genů:

(převzato z Saccharomyces Genome Database, www.yeastgenome.org)

- ***YBR186W, PCH2***

Protein Pch2 představuje jadérkový faktor zabraňující segregaci chromosomů při narušení rekombinace či chromosomální synapse. Také byla potvrzena jeho účast při bloku meiotické interhomologní rekombinace rDNA. Pro případný vztah s *prp45(1-169)* je významný zejména výskytem intronu.

- ***YBR187W, GDT1***

Protein neznámé funkce, který na základě GFP-fúzní exprese vykazuje vakuolární lokalizaci. Ze znalostí expresního profilu a fyzických interakčních partnerů se vyvozuje možná role Gdt1p při biogenezi ribosomu.

- ***YBR188C, NTC20***

Ntc20p tvoří komponentu s Prp19p asociovaného komplexu (komplex NTC) nezbytného pro sestřih pre-mRNA.

- ***YBR189W*, *RPS9B*** (alternativní názvy *RPS13A*, *SUP46*)

Protein Rps9 je součástí malé ribosomální podjednotky (40S), téměř identický s Rps9ap a podobný bakteriálnímu ribosomálnímu proteinu S4 a potkanímu S9. Případný genetický vztah s *prp45(1-169)* by mohl souviset s přítomností intronu.

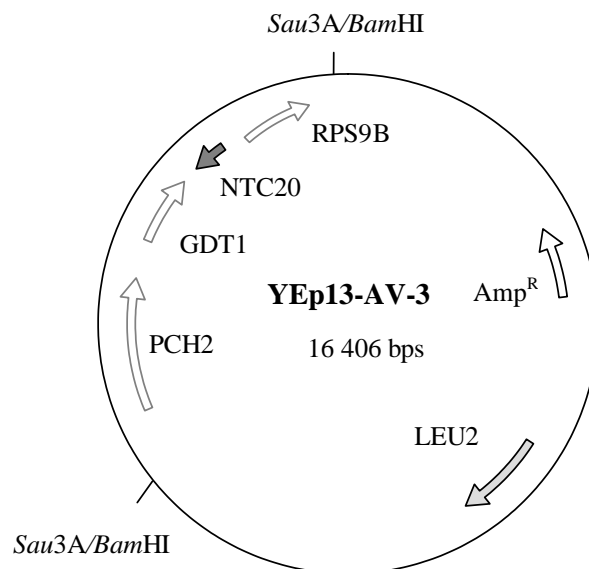
4.7.2.5.1 Příprava plazmidu pAV05 (pRS315-NTC20)

Vhodná restrikční místa pro klonování genu *NTC20* s jeho přilehlým okolím se nepodařilo nalézt, proto byl zvolen totožný postup jako v případě genu *COF1*, klonování s využitím PCR. Navržené primery AV13 a AV14 amplifikují oblast vzdálenou 1033 bp, v níž se nachází ORF genu *NTC20* (423 bp). Použit byl plazmid YEp13-AV-3 (YEp13-#36-2-1). Opět byla zvolena Expand High Fidelity polymeráza (Roche-Boehringer Mannheim, BRD) generující méně chyb při polymeraci, která je vhodná i pro následné TOPO TA klonování (TOPO TA Cloning Kit; Invitrogen, USA).

program AV06:

1. 95°C 2 min
2. 94°C 30 s
3. 48°C 30 s
4. 72°C 1 min
5. 24krát opakovat kroky 2 až 4
6. 72°C 5 min
7. 15°C 1 min
8. konec

Produkt PCR byl vložen do vektoru pCR 2.1 TOPO (*LacZ*, *kan^R*, *amp^R*). Náhodně bylo vybráno šest bílých kolonií, u nichž byla pomocí PCR analyzována přítomnost úseku s genem *NTC20* (primery AV13 a AV14 a program AV06). Před PCR byly buňky vystaveny teplotě 95°C, 3 min. a poté přeneseny na led. Přítomnost plazmidu pCR 2.1 TOPO-NTC20 byla potvrzena u všech testovaných kolonií (data neuvedena).



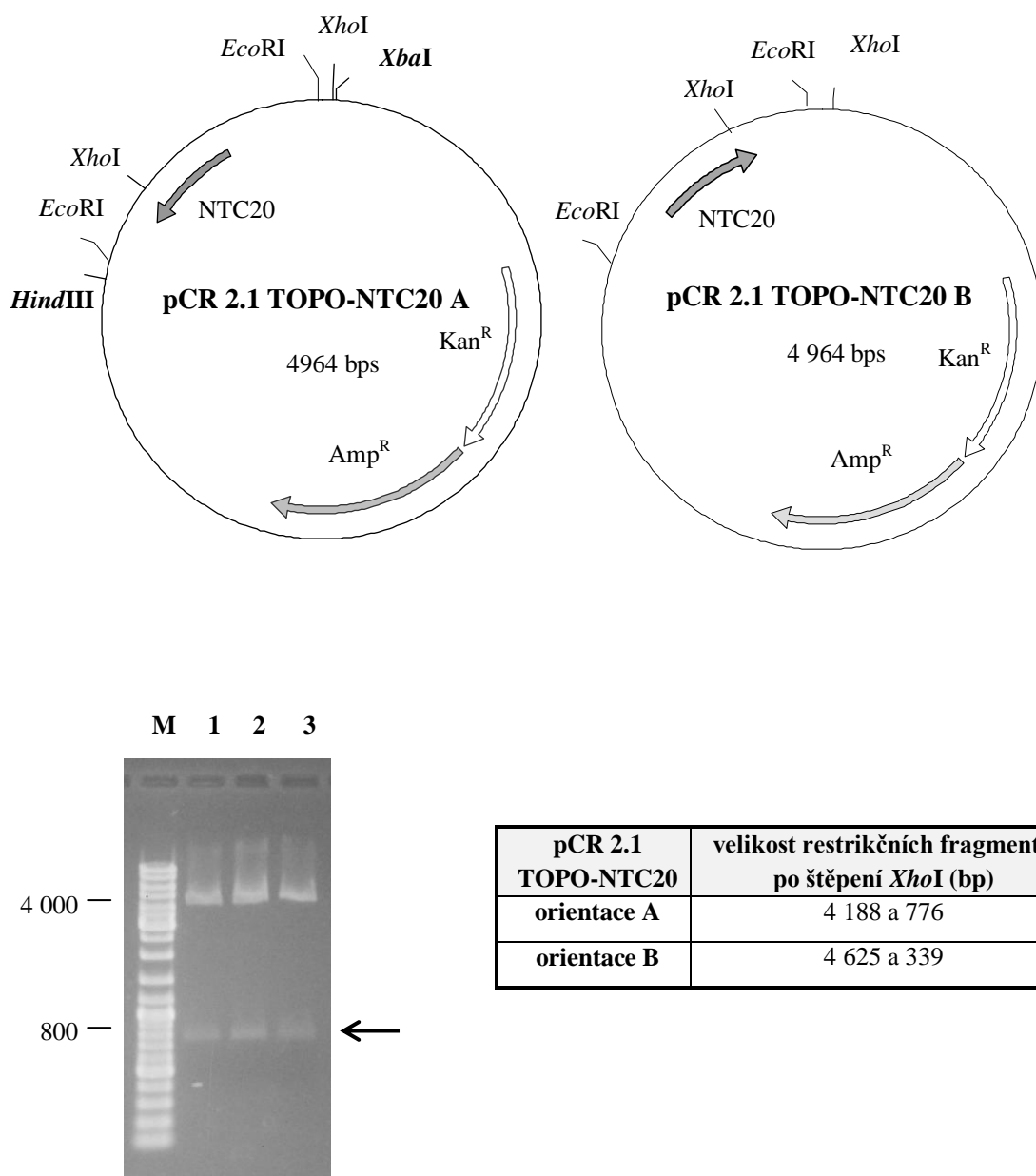
Obr. 4.37. Schematické znázornění plazmidu YEp13-AV-3 (YEp13-#36-2-1), který nese 5 766 nukleotidů dlouhý fragment genomové knihovny se čtyřmi geny.

Genomová knihovna byla připravena štěpením restriční endonukleázou *Sau3A* a klonována do vektoru YEp13 přes restriční místo *Bam*HI (Nasmyth a Tatchell, 1980).

Získaný plazmid, který byl izolován ze tří kolonií *E. coli*, byl restričně ověřen enzymem *Xho*I. Výsledek zobrazuje obr. 4.38, připravený plazmid byl shledán správným s orientací vloženého produktu PCR odpovídající variantě A.

Vektor pRS315 (*LEU2*, *amp*^R, *cen*) byl vybrán pro gen *NTC20* a štěpen restričními endonukleázami *Hind*III a *Xba*I. Shodně byl vyštěpen i gen *NTC20* (délka 1145 bp) z plazmidu pCR 2.1 TOPO-*NTC20* a posléze ligován do vektoru pRS315. Restriční štěpení izolovaného plazmidu potvrdilo jeho správnost a byl pojmenován pAV05 (pRS315-*NTC20*), viz. obr. 4.39.

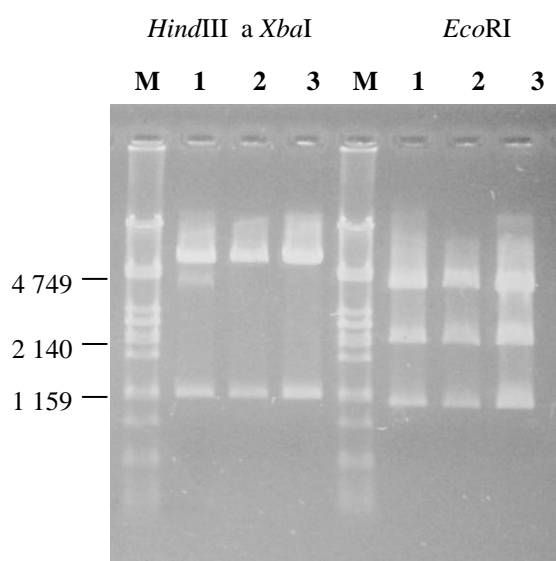
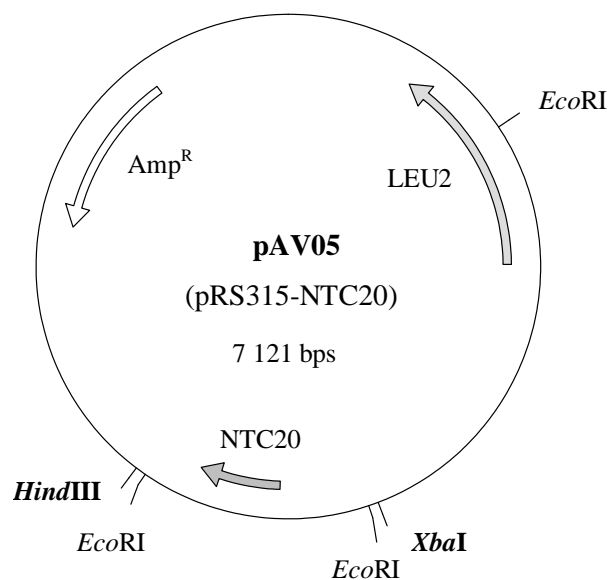
Plazmidem pAV05 byl kmen AVY11 #36 transformován a selekce byla založena na schopnosti růstu na minimálním SD médiu bez aminokyseliny leucin. Narostlé červené kolonie obsahovaly bílé sektory a prokázaly schopnost růstu na médiu s 5-FOA (viz. obr. 4.40).



Obr. 4.38. Restrikční ověření a mapa plazmidu pCR 2.1 TOPO-NTC20.

Izolace plazmidové DNA byla provedena ze tří kolonií *E. coli* (na gelu značeno 1, 2 a 3), které byly vyhodnoceny PCR jako pozitivní na přítomnost genu *NTC20*. Fragment s genem *NTC20* vložený do vektoru pCR 2.1 TOPO může dát vznik dvěma orientacím, orientace A a B, viz. přiložená tabulka. Šipka označuje *XhoI* restrikční fragment velikosti 776 bp odpovídající orientaci A. *EcoRI* místo, které je zobrazeno na mapě plazmidu, ohraničuje oblast určenou pro vkládání produktů PCR. Použit 1% agarózový gel v TAE.

M velikostní marker GeneRuler™ DNA Ladder Mix (#SM0331; MBI Fermentas, Litva)

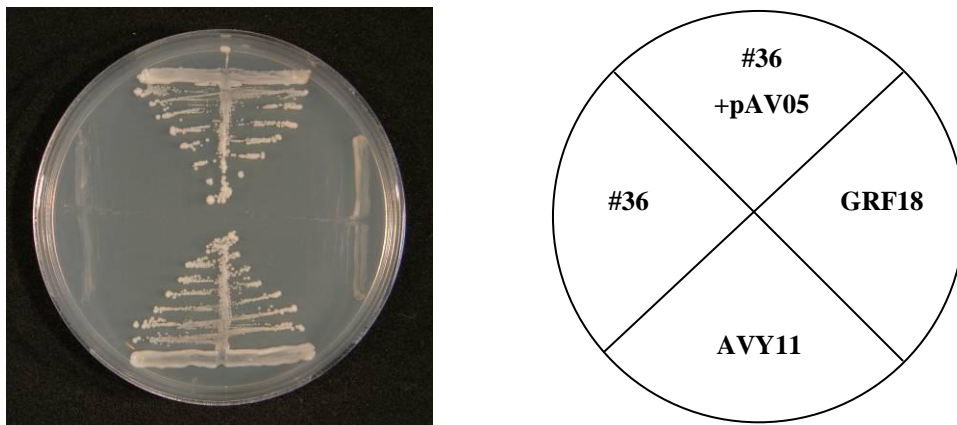


pAV05 (pRS315-NTC20)	velikost restrikčních fragmentů (bp)
<i>HindIII</i> a <i>XbaI</i>	1 145 a 5 976
<i>EcoRI</i>	2 077, 1 015 a 3 993

Obr. 4.39. Restrikční štěpení a mapa plazmidu pAV05 (pRS315-NTC20).

Plazmidová DNA byla izolována celkem ze tří kolonií *E.coli* (na gelu značeno 1, 2 a 3). Vpravo je zobrazeno restrikční štěpení enzymy *HindIII* a *XbaI*, které byly použity pro klonování úseku s genem *NTC20*. Pro ověřovací restrikční štěpení byl zvolen enzym *EcoRI* rozeznávající tři místa ve výsledném plazmidu. Plazmid izolovaný z kolonie *E. coli* nesoucí označení 1 obsahuje pravděpodobně i další místo slabě rozeznávané jedním z dvojice enzymů *HindIII* a *XbaI*. Elektroforeticky analyzováno na 1% agaróze v TAE.

M velikostní marker Lambda/*PstI*



Obr. 4.40. Buňky klonu AVY11 #36 transformované plazmidem pAV05 (pRS315-NTC20) jsou schopné růst na médiu s 5-FOA.

4.7.2.6 Přímé testování plazmidy pAV05 a pAV06

Při rozdělení mutantních klonů pocházejících od kmenů FPY4B a AVY11 do komplementačních skupin (viz. kap. 4.4) byla nalezena skupina o dvou zástupcích, #7 a #31. Proto již nelze očekávat mezi doposud neidentifikovanými klony nález dalšího klonu s mutací v genu *COF1*. Pro klon AVY11 #36 nebyl nalezen komplementační partner od kmene FPY4B, je tedy možná přítomnost mutace v genu *NTC20* u některého klonu pocházejícího od kmene AVY11.

Plazmidy pAV05 (pRS315-NTC20; *NTC20*, *LEU2*; *amp^R*, cen) a pAV06 (pRS315-COF1; *COF1*, *LEU2*; *amp^R*, cen) byly rychlou LiAc metodou transformovány zbývající klony. Celkem byla transformace provedena u 24 klonů, ale žádný z nich nevykazoval vztah syntetické lethality s mutací v genech *COF1* nebo *NTC20*.

Přehled klonů nesoucích mutaci v doposud neidentifikovaném genu synteticky lethálním s *prp45(1-169)*, závěrečné shrnutí:

- kmen **FPY4B** (celkem 15)

#1*	#4	#5*	#6	#8	#9	#10	#11	#13	#14
#15	#17	#18	#19	#20					

poznámka: klony označené * byly připraveny Mgr. Ondřejem Gahurou

- kmen **AVY11** (celkem 9)

#23	#24	#26	#29	#33	#34	#40	#44	#45
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

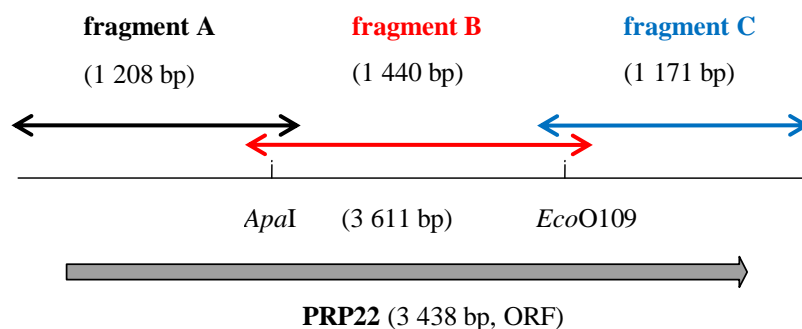
4.8 Identifikace mutace v genu *PRP22* u klonů AVY11 #28, #30 a #38 syntheticky lethálních s *prp45(1-169)*

Celkem byly nalezeny tři klony, které po transformaci plazmidem pSE358-PRP22 mohly ztratit plazmid pOG02 nezbytný k přežití, a proto byly schopné růst na médiu s 5-FOA (viz. kap. 4.7.1.1, obr. 4.21). Všechny tři klony vykazují synthetickou lethaltitu mezi mutací v genu *PRP22* a *prp45(1-169)*, pochází od kmene AVY11 a nesou označení AVY11 #28, #30 a #38. Vzhledem k významným interakčním vztahům na genetické i fyzické úrovni mezi oběma geny, respektive jejich proteinovými produkty, bylo žádoucí určit mutace, které způsobují syntheticky lethální stav. Identifikace mutací byla provedena sekvenováním ORF genu *PRP22*.

Nejprve byla ze všech tří klonů izolována chromosomální DNA. Pro účely sekvenování byla oblast ORF genu *PRP22* rozdělena na tři části, fragmenty A, B a C (viz. obr. 4.41). Chromosomální DNA byla použita jako substrát pro PCR, která dává vznik třem výše uvedeným částečně se překrývajícím úsekům. V místech překryvu se nachází místa, která jsou rozeznávána restričními endonukleázami *ApaI* (překryv fragmentů A a B) a *EcoO109* (překryv fragmentů B a C). Tyto restriční místa lze využít pro případné klonování jednotlivých fragmentů. Všechny použité primery (viz. obr. 4.41) byly navrženy pro podobnou teplotu tání. PCR z genomové DNA byla optimalizována na celkový počet 38 cyklů (viz. program AV05) pro získání dostatečného množství templátu nezbytného k následné sekvenační reakci. Všechny tři získané úseky (fragmenty A, B a C) genu *PRP22* od všech tří klonů byly čištěny NucleoSpin® Extract II a poté sekvenovány s využitím primerů použitých pro předešlé PCR (Laboratoř sekvenace DNA, PřF UK v Praze; www.natur.cuni.cz/~seqlab/).

program AV05:

1. 95°C 2 min
2. 94°C 30 s
3. 45°C 30 s
4. 72°C 1 min
5. 37krát opakovat kroky 2 až 4
6. 72°C 5 min
7. 15°C 1 min
8. konec



Obr. 4.41. Schematické znázornění ORF genu *PRP22* a nejbližšího 5' a 3' okolí.

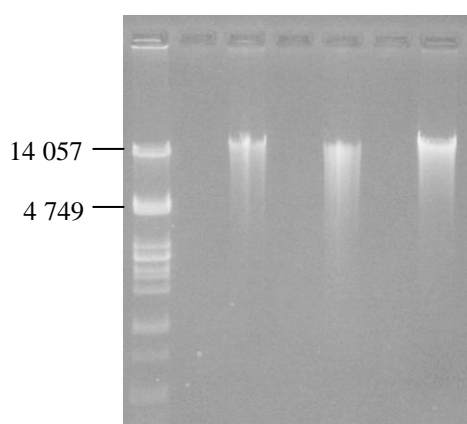
Úsek DNA určený k sekvenaci byl rozdělen na tři části, fragmenty A, B a C. Vzhledem k očekávání mutace v oblasti ORF genu *PRP22* byly primery AV05 a AV10 navrženy co nejbližší počátku a konci transkribované oblasti. Při jejich umístění byl brán zřetel na skutečnost, že při následné sekvenaci nelze počátečních 30-50 bp čtené sekvence správně identifikovat. Oblast nacházející se v bezprostředním okolí 5' a 3' konce je poměrně chudá na výskyt GC párů, proto byla zvolena sekvence vzdálenější, která umožňuje synchronizaci teploty tání všech navrhovaných primerů. Primer AV05 je komplementární s cílovou DNA nacházející se 53 bp před ORF genu *PRP22* (pozice -53 až -36 bp před start AUG), primer AV10 rozeznává sekvenci DNA vzdálenou 120 bp za 3' koncem (pozice +101 až +120 bp za ORF).

fragment A (primery AV05 a AV06)

fragment B (primery AV07 a AV08)

fragment C (primery AV09 a AV10)

- mezi primery AV06 a AV07 překryv 106 bp (restrikční místo *ApaI*)
- mezi primery AV08 a AV09 překryv 102 bp (restrikční místo *EcoO109*)



Obr. 4.42. Izolovaná chromosomální DNA z klonů AVY11 #28, #30 a #38.

Množství chromosomální DNA odpovídá přibližné hodnotě 50-100 ng/jamku gelu. Analyzováno na 1% agaróze v TAE.

M velikostní marker Lambda DNA/*PstI*

Získané sekvence jednotlivých fragmentů byly porovnány mezi sebou a se sekvencí genu *PRP22*, která pochází z databáze *S. cerevisiae* (www.yeastgenome.org). Analýza byla provedena s využitím programů Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW (www.align.genome.jp/clustalw) a BioEdit.

U klonu AVY11 #30 byly identifikovány tři jednonukleotidové záměny G899C, A902C a C904A v úseku fragmentu A. Všechny tři jednonukleotidové záměny představují i změny v kódování příslušných aminokyselinových zbytků (R300P, Q301P, L302I). Výsledky sekvenování všech tří částí genu *PRP22* u klonů AVY11 #28 a #38 neodhalily mutace v oblasti ORF.

5. Diskuze

Cílem předkládané diplomové práce bylo nalézt genetické interakční partnery mutace *prp45(1-169)* *S. cerevisiae* přístupem synthetické lethality. Celkem bylo vytvořeno 33 mutantních klonů a u 11 z nich byl posléze identifikován gen, který nese mutaci syntheticky lethální s *prp45(1-169)*, shrnuto v tab. 5.1.

původní kmen	označení klonu	gen
FPY4B	#7	<i>COF1</i>
	#16	<i>SLU7</i>
AVY11	#22	<i>CEF1</i>
	#28	<i>PRP22</i>
	#30	<i>PRP22</i>
	#31	<i>COF1</i>
	#36	<i>NTC20</i>
	#38	<i>PRP22</i>
	#39	<i>SYF3</i>
	#41	<i>SYF1</i>
	#43	<i>PRP18</i>

Tab. 5.1. Přehled nalezených genů, které obsahují mutaci syntheticky lethální s *prp45(1-169)*.

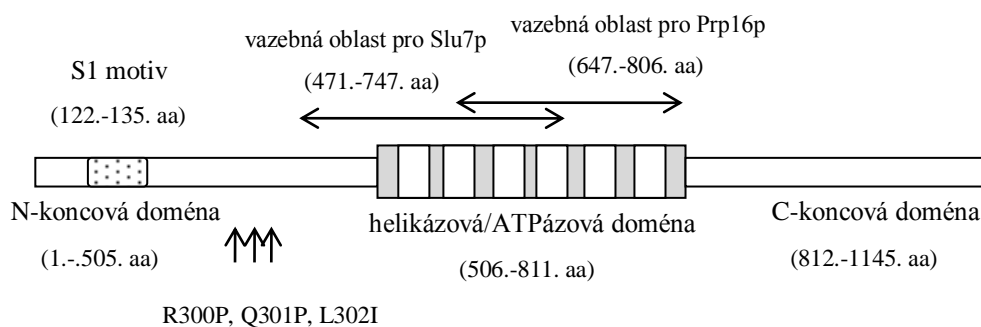
5.1 Faktory druhého kroku sestřihu a role Prp45p

Druhý katalytický krok sestřihu pre-mRNA *S. cerevisiae* vyžaduje přítomnost integrální komponenty U5 snRNA a centrálního proteinu spliceosomu Prp8p. K dalším důležitým faktorům náleží Prp16p, Prp17p, Prp18p, Prp22p a Slu7p, shrnuto v kap. 2.3.5, Literární úvod (Umen a Guthrie, 1995a; Grainger a Beggs, 2005).

Pro mutaci *prp45(1-169)* byla identifikována ve třech případech synthetická lethality s genem *PRP22*. Dále byl prokázán vztah s mutacemi v genech *SLU7* a *PRP18* (viz. tab. 5.1). Vzhledem k velmi blízkému a specifickému vztahu proteinů Prp18, Prp22 a Slu7 jsou následující kapitoly věnovány jejich detailnější charakterizaci.

5.1.1 Prp22p uvolňuje sestřiženou mRNA ze spliceosomu

DEAH box RNA helikáza Prp22p představuje důležitý faktor druhého transesterifikačního kroku, podílí se na kontrole správného výběru 3'sestřihového místa a katalyzuje uvolnění sestřižené mRNA (Schwer a Gross, 1998; Wagner *et al.*, 1998; Mayas *et al.*, 2006). Prp22p je ATPázou stimulovanou RNA substrátem a na ATP závislou RNA helikázou odvinující krátké duplexy nukleových kyselin ve směru 3'→5' (Schwer a Gross, 1998; Wagner *et al.*, 1998; Tanaka s Schwer, 2005). S vysokou afinitou váže jako substrát dvouřetězcovou RNA s 3'jednořetězcovým přesahem, které poskytuje vazebné místo této helikáze. Vazba k DNA nebo duplexu nukleových kyselin byla prokázána slabě. Optimální délka RNA oligomeru vyžadovaná pro asociaci Prp22p byla stanovena minimálně na 20 nukleotidů (Tanaka s Schwer, 2005). Komplementární řetězec, který je odvinován uvolněnou energií získanou při hydrolýze ATP, může být RNA i DNA, ale nebyla vyloučena ani možnost disociace proteinu (tzv. RNPáza). Prp22p je schopná hydrolyzovat všechny běžné energetické substráty včetně jejich deoxy forem, NTP/dNTP (Tanaka a Schwer, 2005).



Obr. 5.1. Zobrazení struktury proteinu Prp22 (130 kDa, 1 145 aa).

Prp22p se skládá z N-koncové (přítomen S1 motiv), centrální helikázové/ATPázové a C-koncové domény. Pozice aminokyselinových záměn identifikovaných u mutantního klonu AVY11 #30 (R300P, Q301P, L302I) jsou označeny šipkou. Tabulka zobrazuje pozice sedmi významných helikázových/ATPázových motivů nezbytných pro funkci proteinu (shrnuje dle Schwer a Meszaros, 2000; van Nues a Beggs, 2001; Campodonico a Schwer, 2002; Schneider *et al.*, 2002, 2004).

helikázová/ATPázová doména motiv a oblast (aa)	
I. GETGSGKT	506-513
I.a TQPRRVAA	534-541
II. DEAH	603-606
III. SAT	635-637
IV. LxFxTG	695-700
V. TNIAETSxT	757-765
VI. QRxGRAGR	804-811

Struktura proteinu Prp22 sestává z N a C-koncové domény obklopující centrální esenciální helikázovou/ATPázovou část, která obsahuje sedm významných motivů (Gorbalenya a Koonin, 1993; de la Cruz *et al.*, 1999). Motivy I, II a VI jsou podstatné pro vazbu a hydrolýzu NTP. Na helikázové funkci mají zřejmě podíl motivy Ia, IV a V. Motiv III se nachází ve flexibilní části proteinu a umožňuje propojení energie uvolněné z hydrolýzy NTP s vykonáním mechanické práce v podobě helikázové aktivity. Mutace, které vyřadí z funkce ATPázovou činnost, znemožňují následně rozpad spliceosomálního komplexu *in vitro* a vykazují pro buňky lethality *in vivo*. Při narušení helikázové aktivity dochází obvykle ke vzniku závažných růstových fenotypů související s defekty při rozvolnění spliceosomálního uspořádání nebo v horším případě vedou až ke smrti buňky (Schwer a Meszaros, 2000; Campodonico a Schwer, 2002; Schneider *et al.*, 2002, 2004). Při deleční analýze Prp22p byla stanovena minimální funkční oblast pokrývající délku 262.-1145. aminokyselinového zbytku, která je dostatečná pro funkci *in vivo*. V úseku 177.-256. aminokyselinového zbytku se nachází RNA vazebný S1 motiv, který je pro funkci Prp22p postradatelný (Schneider a Schwer, 2001). N-koncových 350 aminokyselinových zbytků je *in vivo* neesenciálních pouze za předpokladu silné nadprodukce zbývajících částí proteinu. Delece 465 aminokyselinových zbytků již způsobuje u buněk lethality *in vivo*, ale dostačuje pro vazbu RNA, helikázovou a ATPázovou aktivitu i jadernou lokalizaci *in vitro* (Schneider a Schwer, 2001).

5.1.2 Vztah Prp22p k sestřihovým faktorům Slu7p a Prp45p

Trojita aminokyselinová záměna identifikovaná v této práci u mutantního klonu AVY11 #30 se nachází v oblasti N-koncové domény, poloha aminokyselinových záměn R300P, Q301P, L302I, nikoliv v centrální esenciální části důležité pro ATPázovou a helikázovou funkci. Na základě výsledků předchozí deleční studie je zřejmé, že úsek mezi 262. a 350. aminokyselinovým zbytkem je odpovědný za efektivní směřování a vazbu k spliceosomu (Schneider a Schwer, 2001).

M._musculus	RLTRISDPEKWEIKQMTAANVLSKEEFPDFDEETG----
H._sapiens	RLTRISDPEKWEIKQMTAANVLSKEEFPDFDEETG----
R._norvegicus	RLTRISDPEKWEIKQMTAANVLSKEEFPDFDEETG----
C._elegans	ARVRISTPERWEIRQMAGVLTATDMPDFDEEMG----
S._cerevisiae_#30	-RRALTSPERWEIPPIASGAASIDDYPELKDEIPINTS
S._cerevisiae	-RRALTSPERWEIRQLIASGAASIDDYPELKDEIPINTS
C._glabrata	-KRKLTSERWEIRQLIASGMASIKDYPELLKYDQK---
C._albicans	-KRKLTSERWEIRQLISSGAVSADDYPELD-----
	: : * : * : : : : : : : * : :

Obr. 5.2. Třiaminokyselinová záměna identifikovaná u Prp22p klonu AVY11 #30 (R300P, Q301P, L302I).

Mutace se nachází v poměrně konzervované oblasti proteinu porovnané se sekvencemi příbuzných kvasinek třídy Saccharomycetes, *C. albicans* a *C. glabrata*, a některých zástupců vyšších eukaryot. Jednotlivé aminokyselinové zbytky, u nichž došlo k záměně, jsou zcela konzervovány nebo alespoň vykazují podobnost (sekvence byly získány z NCBI, www.pubmed.com; a Saccharomyces Genome Database, www.yeastgenome.org; k analýze byl využit program Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW, www.align.genome.jp/clustalw).

Interakce se sestřihovým komplexem je u proteinu Prp22 patrně iniciována helikázou Prp16p a následná efektivní asociace je zřejmě umožněna vazbou s faktorem druhého kroku sestřihu, Slu7p, a proteinem Prp45 (McPheeters *et al.*, 2000; van Nues a Beggs, 2001; James *et al.*, 2002; Albers *et al.*, 2003; Gahura *et al.*, přijato do tisku). Při dvouhybridním testování interakce proteinů Prp22 a Prp45 byla blíže specifikována C-koncová oblast (mezi 262.-291. aa; Albers *et al.*, 2003) chybějící v deleční variantě Prp45p používané v této diplomové práci. Na základě výsledků nalezených ve výše jmenované publikaci však nelze vyloučit ani postradatelnost N-koncové části Prp45p pro efektivní vazbu proteinu Prp22, neboť většina izolovaných fragmentů uvedenou oblast obsahovala (viz. obr. 5.3). Lze se domnívat, že v rámci struktury, která vzniká při složení proteinu do nativní konformace, může být součástí vazebného místa pro Prp22p i zmíněná oblast N-konce proteinu Prp45. Při hledání interakčních partnerů Prp45p nebyl učiněn ani v jediném případě nález proteinu Prp22, ačkoliv v opačném případě patří faktor Prp45 k frekventovaným vazebným partnerům této RNA helikázy. Interakce obou proteinů je pravděpodobně slabého nebo nepřímého charakteru a některý sestřihový faktor se může podílet na stabilizaci uvedené vazby. Pravděpodobným kandidátem na regulační faktor by teoreticky měl být protein Slu7. Nelze však popřít ani druhou variantu, kdy za vazbu Prp22p k spliceosomu odpovídá Slu7p a Prp45p se účastní stabilizace jejich slabé interakce. Nicméně přímá vazba Slu7p a Prp45p nebyla zjištěna a interakce proteinu Prp22 se Slu7p je velmi slabá.

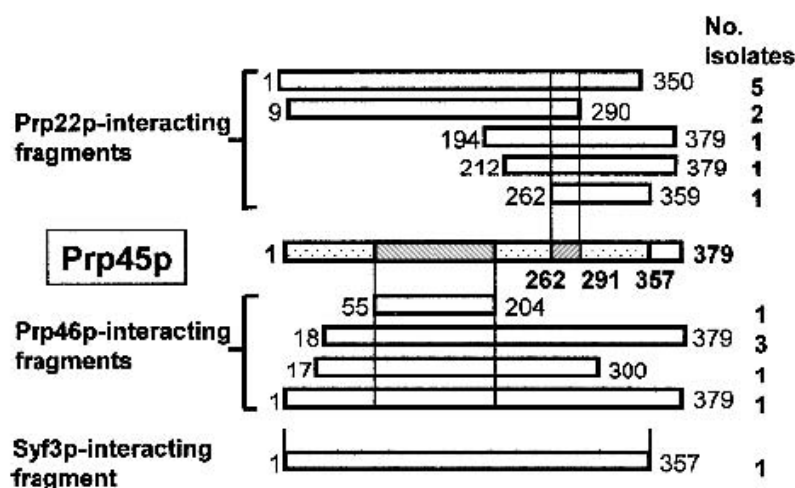
Na základě tandemové afinitní purifikace (TAP) prostřednictvím proteinu Cwc2 (TAP-tagged Cwc2, tvoří podjednotku komplexu NTC) byly v naší laboratoři izolovány spliceosomální komplexy z buněk exprimujících divokou alelu *PRP45* a buněk obsahujících mutaci *prp45(1-169)*. Při následném porovnání proteinového složení izolovaných komplexů hmotnostní spektrometrií bylo zjištěno kvantitativní snížení přítomnosti RNA helikázy Prp22p v komplexu s C-koncovou deleční verzí Prp45p (Gahura *et al.*, přijato do tisku). Ze získaných výsledků vyplývá, že protein Prp45 se skutečně podílí na vazbě nebo případně regulaci Prp22p v rámci druhého kroku sestřihu.

Dojde-li k nadprodukci divoké varianty proteinu Prp22 nastává částečné potlačení citlivosti buněk *prp45(1-169)* k nepermisivní teplotě 37°C (Gahura *et al.*, přijato do tisku). Koexprese N-koncové varianty proteinu, Prp45(1-169), s Prp45(119-379) *in trans* také potlačuje citlivost buněk k uvedené teplotě a vrací průběh sestřihu pre-mRNA na úroveň divoké verze proteinu Prp45 (testováno na reporterovém systému *ACT1-CUP1*, viz. kap. 2.3.6, Literární úvod). Na základě znalosti schopnosti některých proteinů orthologních k lidskému SKIP/NCoA-62/SNW1 tvořit oligomerní uspořádání lze předpokládat, že obě varianty Prp45p se mohou vzájemně vázat překryvnými úseky. Druhé možné vysvětlení neočekává přímou interakci obou odděleně exprimovaných fragmentů. Protein Prp45 může sloužit v rámci spliceosomu jako strukturní kostra pro vazbu jiných faktorů, tedy přítomnost C-koncové části nezávisle na N-koncovém úseku umožní opětovné efektivní vyvázání některých sestřihových proteinů (např. Prp22p). Prp45p obsahuje ve své struktuře polyprolinový (121.-152. aa) a helikální motiv (197.-253. aa) a SH₂-like doménu (274.-344. aa), které by mohly zprostředkovávat jednotlivé protein-proteinové interakce. Koexprese obou koncových variant proteinu *in trans*, Prp45(1-169) s Prp45(119-379), opět vrací i intenzitu vazby proteinu Prp22 k spliceosomu na stejnou úroveň detekovanou v přítomnosti neovlivněné verze Prp45p (TAP-tagged Cwc2 analýza).

Buňky exprimující C-koncově zkrácenou variantu Prp45p (postrádají oblast 262.-291 aa) vykazují zřejmě velmi oslabenou vazbu k Prp22p zprostředkovanou pouze N-koncovou částí. Náhodně generovaná mutace u genu *PRP22* klonu AVY11 #30 mohla u proteinového produktu zapříčinit narušení buď již velmi slabé vazby k Prp45p nebo k druhému partnerovi, Slu7p. Vezmeme-li však v úvahu jednodušší vysvětlení, kdy za vzájemnou interakci odpovídá výhradně nalezený fragment

262.-291. aminokyselinového zbytku u Prp45, pak v buňkách *prp45(1-169)* je za vazbu Prp22p k spliceosomu odpovědný pouze faktor Slu7p. Minimální interakční oblast Prp22p nezbytná pro vazbu proteinu Slu7 byla stanovena na úsek mezi 471.-747. aminokyselinovým zbytkem. Identifikované tříaminokyselinové záměny u proteinu Prp22 se nachází v pozici 300.-302. aa a nachází se tedy v blízkosti oddelečnými studiemi stanovené interakční oblasti pro Slu7p. Ozařováním generovaná mutace se proto může vyskytovat přímo ve vazebném místě a ovlivňovat tak jeho konformaci. Na základě porovnání této oblasti s příbuznými kvasinkami rodu *Candida* bylo shledáno, že se jedná o velmi konzervovaný úsek. Významná podobnost byla shledána i při srovnání s vyššími eukaryoty. Identifikované aminokyselinové záměny vyvolávají změnu náboje, což by mohlo zapříčinit strukturní změny v dané části proteinu.

Na detailnější charakterizaci nalezené oblasti Prp22p a určení případného faktoru, který se k ní váže (Prp45p, Slu7p nebo jiný protein), se v současné době v naší laboratoři intenzivně pracuje. Nalezené výsledky velmi významně dopomohou k lepšímu pochopení funkčního propojení všech tří sestříhových faktorů.



Obr. 5.3. Protein-proteinové interakce vztahující se k sestříhovému faktoru Prp45p.

Čísla zobrazují pozice aminokyselinových zbytků, které ohraničují fragmenty Prp45p identifikované při dvouhybridním testování se třemi vazebnými partnery, Prp22p, Prp46p a Syf3p. Minimální překryvný úsek vazby Prp22p k proteinu Prp45 se nachází v oblasti SH₂-like domény (262.-291. aa). Vpravo je zobrazen počet izolací, tzn. kolikrát byl individuální fragment nalezen při dvouhybridní analýze (Albers *et al.*, 2003).

U mutantního klonu AVY11 #30 byla dále zjištěna citlivost ke zvýšené kultivační teplotě 37°C. Uvedená skutečnost by mohla potvrzovat, že došlo v přítomnosti záměny tří aminokyselin k oslabení vazby proteinu Prp22 k spliceosomu. Po transformaci plazmidem YEp13-PRP45 dochází u tohoto klonu k tvorbě kolonií výrazně nepravidelného tvaru (viz. kap. 4.5.1, Výsledky). Plazmid pOG02 (*cenΔ*) i YEp13-PRP45 (2μ) obsahují gen *PRP45* s vlastním promotorem, nicméně rozdíl mezi nimi je v počtu kopií, které oba plazmidy generují. Červené oblasti kolonií nesou jak pOG02, tak YEp13-PRP45. Nadprodukce proteinového produktu divoké alely *PRP45* zřejmě ovlivňuje efektivnější schopnost vazby Prp22p k sestřihovému komplexu, a proto tyto oblasti kolonií rostou lépe. Uvedený projev by naznačoval, že u buněk klonu AVY11 #30 došlo vlivem mutace k oslabení vazby proteinu Prp22 právě s Prp45p a růstový defekt je mírně potlačen přítomností jeho vyšší hladiny v buňce. Jsou-li obě fenotypová pozorování, citlivost k teplotě 37°C a rozdílné schopnosti růstu buněk s odlišnou hladinou Prp45p, způsobena nalezenou aminokyselinovou záměnou v Prp22p (R300P, Q301P, L302I), je cílem dalších studií.

Affinity capture-MS²⁴	Cef1p, Cdc5p, Prp19p, Ubp1p, Sok2p, Syf3p (Clf1p), Bud31p
Two hybrid²⁵	Prp16p, Syf3p (Clf1p), Slu7p, Prp45p, Pmi40p, Dbp7p, Msl5p
Synthetic growth defect²⁶	Syf3p (Clf1p)
Synthetic lethality²⁷	Prp17p (Cdc40p), Snu114p
Synthetic rescue²⁸	Prp8p, Shm1p, Tub1p

Tab. 5.2. Přehled proteinů, které vstupují s Prp22p do fyzické nebo genetické interakce
(dle Saccharomyces Genome Database, www.yeastgenome.org).

Mgr. Ondřej Gahura dále pokračoval ve studiu klonů AVY11 #28 a #38, u kterých nebyla nalezena mutace v oblasti ORF genu *PRP22*. U obou mutantních klonů

²⁴ Protein-návnada je afinitně vytažen z buněčného extraktu pomocí polyklonálních protilátek nebo za využití epitopového tagu. Asociované proteiny s proteinem-návnadou jsou poté identifikovány metodou MS.

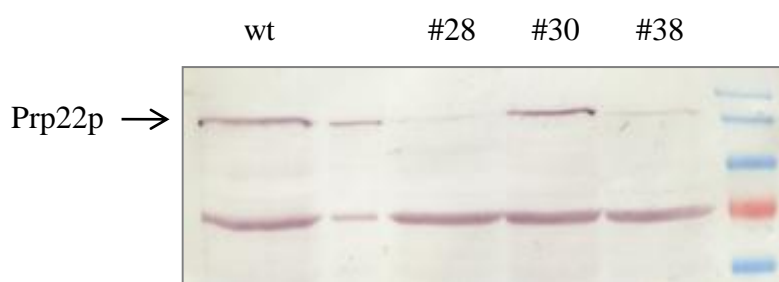
²⁵ Protein-návnada je fúzovaný s DNA-vazebnou doménou, protein-kořist (nejčastěji představuje knihovnu proteinů) je fúzovaný s DNA-aktivační doménou. Specifická interakce mezi těmito dvěma částmi umožní aktivaci transkripce určitého selekčního nebo detekčního genu.

²⁶ Mutace v oddělených genech, kdy každý jimi produkováný protein sám o sobě způsobuje minimální fenotyp, zapříčiní závažný růstový defekt při kombinaci obou těchto mutací.

²⁷ Je situace, kdy kombinace dvou mutací je pro buňku lethální, přestože samotný výskyt každé z nich lethality nezpůsobí.

²⁸ Protein suprimuje lethální efekt delece genu, je-li nadprodukován.

prokázal výrazně nižší hladinu proteinu Prp22 při porovnání s kmenem AVY11 (divoká alela genu *PRP22*). Nižší míra exprese je pravděpodobně také ve vztahu syntetické lehality s mutací *prp45(1-169)*, viz. obr. 5.4. V buňkách je přítomno tak malé množství Prp22p, které není zřejmě efektivně vyvazováno prostřednictvím C-koncově deletovaného proteinu Prp45 a/nebo Slu7p.



Obr. 5.4. Detekce míry exprese Prp22p u klonů AVY11 #28, #30 a #38 metodou western blot (provedl Mgr. Ondřej Gahura).

Protein Prp22 dosahuje hmotnosti 130 kDa (označeno šipkou), značeno anti-Prp22 protilátkou (B. Schwer). Klon AVY11 #28 a #38 vykazují sníženou hladinu proteinu, klon AVY11 #30 má srovnatelnou míru exprese s kmenem AVY11 (wt).

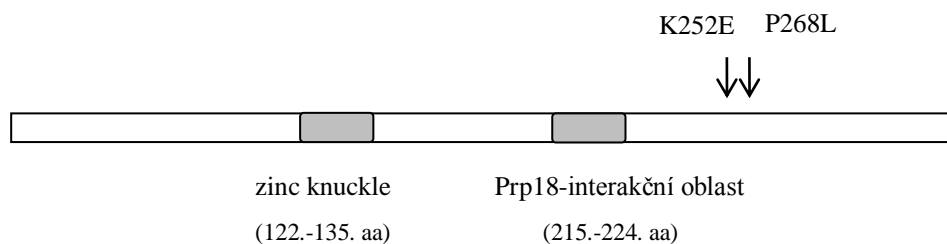
5.1.3 Protein Prp22 potlačuje sestřih aberantních substrátů

Helikáza Prp22p se podílí na kontrole správně zvoleného 3'sestřihového místa (Mayas *et al.*, 2006). Protein Prp22 interaguje s 3'koncem intronu (posledních osm nukleotidů) ve fázi před ligací exonů (McPheeters a Muhlenkamp, 2003). Náležitě vázané sestřihové intermediáty v rámci sestřihového komplexu zřejmě způsobují blok ATPázové a helikázové aktivity Prp22p do fáze, než dojde k ligaci exonů. Po řádné ligaci, která způsobí strukturní změny spliceosomu, byl prokázán posun vazby Prp22p do oblasti exonu 2 vzdáleného minimálně třináct nukleotidů za místem ligace. Uvedená oblast exonu splňuje všechny požadavky pro funkci RNA helikázy Prp22p, která působí ve směru 3'→5' při uvolnění mRNA rozrušením interakce zřejmě s U5 snRNP (Aronová *et al.*, 2007; Schwer, 2008). Při vzniku aberantního uspořádání spliceosomu patrně nedochází k potlačení aktivity RNA helikázy, která následně destabilizuje konformaci potřebnou pro druhý krok a užívá energii uvolněnou hydrolýzou ATP k odstranění aberantních substrátů (Mayas *et al.*, 2006; Schwer, 2008).

Proteiny Prp45 a/nebo Slu7 v souvislosti s RNA helikázou Prp22p působí zřejmě při procesu vazby a výběru řádných 3'sestřihových míst (Umen a Guthrie, 1995a; McPheeters a Muhlenkamp, 2003; Gahura *et al.*, přijato do tisku). Podobná vlastnost již byla prokázána pro lidského orthologa, protein SKIP (viz. kap. 2.3.6, Literární úvod). Práce pocházející z letošního roku předpokládá možnou úlohu neznámého faktoru ve vztahu k negativní regulaci ATPázové a helikázové funkce Prp22p do fáze ligace exonů (Schwer *et al.*, 2008). Nejpravděpodobnější uchazeči na uvedenou roli jsou tedy Prp45p a/nebo Slu7p.

5.1.4 Funkční propojení proteinů Slu7, Prp18 a Prp22

Gen *SLU7* byl nalezen při identifikaci syntheticky lethálních partnerů mutace nacházející se ve smyčce 1 U5 snRNA. Odtud také pochází označení SLU: synergistic lethal with U5 snRNA (Frank *et al.*, 1992; Frank a Guthrie, 1992). Slu7p obsahuje zinc knuckle motiv a PRP18-interakční oblast, oba motivy jsou neesenciální, ale při narušení jednoho z nich nastává nepostradatelnost druhého, viz. obr. 5.5. (Frank a Guthrie, 1992; Zhang a Schwer, 1997; James *et al.*, 2002). RNA vazebný motiv zinc knuckle byl původně nalezen u nukleokapsidových proteinů, které se podílí na vazbě genomové RNA do retrovirové partikule a obsahuje sekvenci bohatou na přítomnost aminokyseliny cystein (Rein, 1994). U proteinu Slu7 je patrně odpovědný za vazbu k sestřihovému komplexu (Frank *et al.*, 1992; James *et al.*, 2002). Vzhledem k účasti Slu7p na přímé vazbě a výběru 3'sestřihového místa by cílem zinc knuckle motivu mohla být prozatím blíže nespecifikovaná oblast intronu, neboť vazba k U5 snRNP nebo i jiným partikulím byla vyloučena (Umen a Guthrie, 1995a; McPheeters a Muhlenkamp, 2003). Prp18-interakční oblast Slu7p zprostředkovává přímou vazbu k Prp18p (testováno dvouhybridním systémem; Zhang a Schwer, 1997). Specifické mutace generované v této části proteinu zruší jejich vzájemnou interakci *in vitro* a vedou ke vzniku teplotně citlivé mutanty Slu7p *in vivo* (James *et al.*, 2002). Zmíněný nález je v souladu s výsledky analyzujícími postradatelnost Prp18p pro sestřih pre-mRNA při teplotě 23°C *in vitro* i *in vivo*. Delece *PRP18* vyvolává až stonásobné snížení účinnosti průběhu druhého kroku sestřihu *in vitro* (Horowitz a Abelson, 1993). V buňkách *prp18Δ* nadprodukujících protein Slu7 dochází k potlačení citlivosti ke zvýšené teplotě (Zhang a Schwer, 1997).

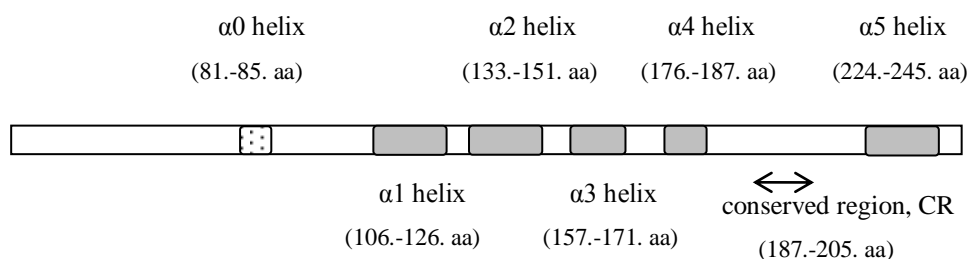


Obr. 5.5. Schematické znázornění struktury proteinu Slu7 (382 aa, 44,6 kDa), který obsahuje zinc knuckle motiv a Prp18-interakční oblast (Frank a Guthrie, 1992; Zhang a Schwer, 1997).

Mutace v genu *SLU7*, FPY4B #2 (P268L) a FPY4B #16 (K252E), které vykazují synteticky lethální stav s *prp45(1-169)*, jsou znázorněny šipkou a byly identifikovány Mgr. Vandou Munzarovou (2007).

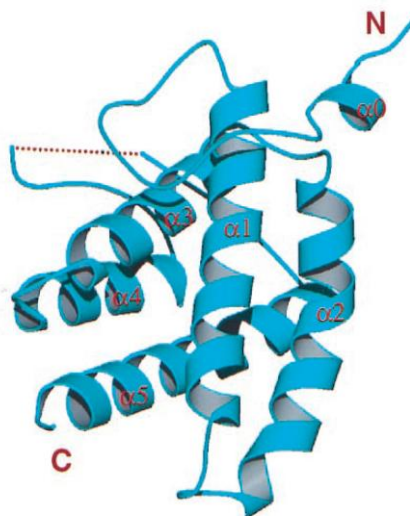
Kompaktní globulární struktura Prp18p s motivem pěti α helixů (five-helix X-bundle) sestává ze dvou částí, kdy první je odpovědná za vazbu k proteinu Slu7. Druhá oblast je naopak evolučně velmi konzervovaná (viz. obr. 5.7) a nachází se na protilehlé straně proteinu Prp18 (Jiang *et al.*, 2000). Konzervovaná oblast smyčky 5 délky devatenácti aminokyselinových zbytků tvoří flexibilní část druhé oblasti a podílí se společně s Prp8p na stabilizaci vazby smyčky 1 U5 snRNA s oblastí exonu 1 a 2 (Teigelkamp *et al.*, 1995a; Bačíková a Horowitz, 2005; Aronová *et al.*, 2007). Delece nejvíce konzervovaných 19 aminokyselinových zbytků, mutanta *prp18 Δ CR*, působí lethality u buněk kultivovaných v teplotě 37°C, viz. obr. 5.6 (Bačíková a Horowitz, 2002, 2005; Crotti *et al.*, 2007).

Druhý krok sestřihu pre-mRNA lze rozdělit na dvě fáze, první je na ATP závislá a následující nikoliv. Energie uvolněná při hydrolýze ATP katalyzované RNA helikázou Prp16p vyvolává konformační změny, které umístí 3'sestřihové místo do katalytického centra spliceosomu (Schwer a Guthrie, 1992). Následuje vazba faktorů druhé na ATP nezávislé fáze, jejichž pořadí je specifikováno, Slu7p, Prp18p a Prp22p (James *et al.*, 2002). Protein Slu7 je vázán v rámci spliceosomu ve fázi působení Prp16p velice slabě, pravděpodobně prostřednictvím již zmíněného zinc knuckle motivu a interakcí s jinou helikázou Brr2p asociovanou s U5 snRNP (James *et al.*, 2002; van Nues a Beggs, 2001). Následuje vazba Prp18p, která stabilizuje asociaci Slu7p se spliceosomem (James *et al.*, 2002). Oba faktory jsou esenciální pro sestřih pre-mRNA při vzdálenosti mezi branchpoint a 3'sestřihovým místem větším než sedm nukleotidů v případě Slu7p a dvanácti pro Prp18p (Zhang a Schwer, 1997; Brys a Schwer, 1996). Při kratší délce je malá jaderná ribonukleoproteinová partikule U5 vázána dostatečně pevně pouze za přítomnosti Prp8p (Teigelkamp *et al.*, 1995a; Aronová *et al.*, 2007).



Obr. 5.6. Protein Prp18 (251 aa, 29 kDa) obsahuje centrální motiv five-helix X-bundle.

Oblast proteinu Prp18 odpovědná za interakci se Slu7p není výrazně evolučně konzervovaná a vykazuje přítomnost pozitivně nabitých aminokyselinových zbytků. Minimální nezbytná délka (98.-179. aa) odpovědná za vazbu Slu7p byla stanovena dvouhybridní analýzou, přesto v rámci terciální struktury proteinu se na interakci účastní ještě další pozitivní aminokyselinové zbytky z odlišných částí proteinu. Na asociaci Slu7p se přímo podílí helixy $\alpha 1$ a $\alpha 2$, naopak helix $\alpha 5$ váže jinou/jiné komponenty spliceosomu a toto uspořádání umísťuje smyčku 5 do oblasti interakce s konzervovanou smyčkou 1 U5 snRNA. (shrnutí dle Jiang *et al.*, 2000; Bačíková a Horowitz, 2002, 2005; Crotti *et al.*, 2007).



Obr. 5.7. Krystalografická struktura Prp18 Δ 79.

Varianta proteinu Prp18 Δ 79 je zcela funkční při sestřihu pre-mRNA *in vitro* a nezpůsobuje růstové defekty *in vivo*, krystalizace celé délky Prp18p nebyla možná (Jiang *et al.*, 2000; Bačíková a Horowitz, 2002). Struktura proteinu Prp18 sestává z centrální konzervované oblasti obsahující motiv pěti α helixů (five-helix X-bundle), značeno $\alpha 1$ - $\alpha 5$. Na N-konci je přítomen velice krátký $\alpha 0$ helix spojený s $\alpha 1$ helixem 20 aminokyselinových zbytků dlouhou smyčkou. Helixy $\alpha 1$ a $\alpha 2$ se nachází v identické rovině umístěné pod úhlem 50° k helixům $\alpha 4$ a $\alpha 5$ a helix $\alpha 3$ je spojuje. Tečkovaně je zobrazena 36 aminokyselinových zbytků dlouhá smyčka 5 tvořená 25 konzervovanými zbytky z nichž 19 je velmi výrazně evolučně konzervovaných (zobrazeno MOLSCRIPT, převzato a upraveno dle Jiang *et al.*, 2000).

Při delší vzdálenosti je nezbytná asociace Slu7p a protein Prp18 zprostředkovává přemostění mezi Slu7p a U5 snRNP a upevňuje vazbu této partikule k 3'sestřihovému místu (Jiang *et al.*, 2000). Přímá vazba mezi Slu7p a U5 snRNA nebyla identifikována, ale existuje mezi nimi genetická interakce (Frank *et al.*, 1992). Faktor Slu7p zřejmě za spolupráce proteinu Prp45 poté vyvazuje helikázu Prp22p (Albers *et al.*, 2003; Gahura *et al.*, přijato do tisku).

V naší laboratoři byly získány celkem dvě rozdílné mutace v genu *SLU7* a jedna v genu *PRP18* způsobující v kombinaci s *prp45(1-169)* synthetickou lethaliu. V případě *slu7* se jedná o mutantní klon FPY4B #2, který našel Mgr. Ondřej Gahura, a klon FPY4B #16 identifikovaný v této práci. Posléze Mgr. Vanda Munzarová ve své diplomové práci analyzovala místa mutací u obou mutantních alel, FPY4B #2 (*slu7*, P268L) a FPY4B #16 (*slu7*, K252E) a funkčně charakterizovala jejich proteinové produkty (Gahura *et al.*, přijato do tisku). Nalezené mutace se vyskytují ve velmi konzervované oblasti proteinu, která nebyla funkčně charakterizována (viz. obr. 5.5). Narušují-li získané mutace roli Slu7p ve vztahu k vazbě, případně ve výběru řádného 3'sestřihového místa je předmětem probíhajícího studia. Druhý možný vliv mutací na funkci Slu7p je spojen s proteinem Prp18 nebo Brr2. Oblast odpovědná za vazbu Brr2p u proteinu Slu7 není známa. Při uspořádání proteinu do nativní konformace by mohl být výskyt nalezených mutací, K252E a P268L, např. v okolí PRP18-interakční oblasti (215.-224. aa), neboť vazebný úsek byl stanoven na základě deleční studie analyzující minimální nezbytnou část odpovědnou za interakci (Zhang a Schwer, 1997; James *et al.*, 2002). Za absence Prp18p bylo prokázáno, že RNA helikáza Prp22p je vázána slaběji, neboť protein Slu7 je asociován se spliceosomem pouze za účasti motivu zinc knuckle (James *et al.*, 2002). Za předpokladu interakce Prp22p se sestřihovým komplexem pomocí Slu7p a/nebo Prp45p lze vyvozovat, že při deleci C-konce Prp45p je zřejmě asociace helikázy prostřednictvím mutovaného proteinu Slu7 (zrušení nebo částečné narušení vazby s Prp18p) natolik oslabena, že posléze nedostačuje některé ze svých funkcí při sestřihu.

Při závěrečném sepisování této práce probíhala identifikace mutace genu *PRP18* v příslušném mutantním klonu (viz. tab. 5.1), proto lze o genetickém vztahu pouze spekulovat. Pro protein Prp18 byl nalezen jediný sestřihový partner faktor Slu7p a na genetické úrovni interaguje s *PRP17*, *SLU7* a *PRP8*. Náhodně generovaná mutace mohla narušit interakci Prp18p s faktorem Slu7p a následná lethality by měla

velmi podobné vysvětlení jako u předešlých mutací v genu *slu7*. Během druhého kroku sestřihu stabilizuje Prp18p společně s Prp8p asociaci U5 snRNP s 3'sestřihovým místem, nicméně oba faktory spolu přímo neinteragují. Umístění mutace v oblasti smyčky 5 Prp18p by naznačovalo oslabení schopnosti stabilizace spojení této ribonukleoproteinové partikule s exonovými úseky. RNA helikáza Prp22p po druhém kroku uvolňuje mRNA ze spliceosomu rozrušením zmíněné asociace (Teigelkamp *et al.*, 1995a; Schneider *et al.*, 2004; Bačíková a Horowitz, 2005; Aronová *et al.*, 2007). Delece konzervované oblasti 19 aminokyselinových zbytků ve smyčce 5, *prp18ΔCR*, nemá vliv na intenzitu vazby Prp22. V přítomnosti *prp45(1-169)* by velmi specificky záleželo na charakteru generované mutace. Narušení stabilizační vlastnosti Prp18p a zároveň oslabení asociací proteinu Prp22 se spliceosomem by mohlo vést k lethalitě. Vytvořená mutace by však mohla i způsobit silnější interakci Prp18p se smyčkou 1 U5 snRNA, kterou slabě asociovaná helikáza Prp22p není schopna rozvolnit. Poslední možnost místa mutace se naskytuje v oblasti helixu $\alpha 5$, který se váže k blíže neurčené komponentě spliceosomu (Bačíková a Horowitz, 2002).

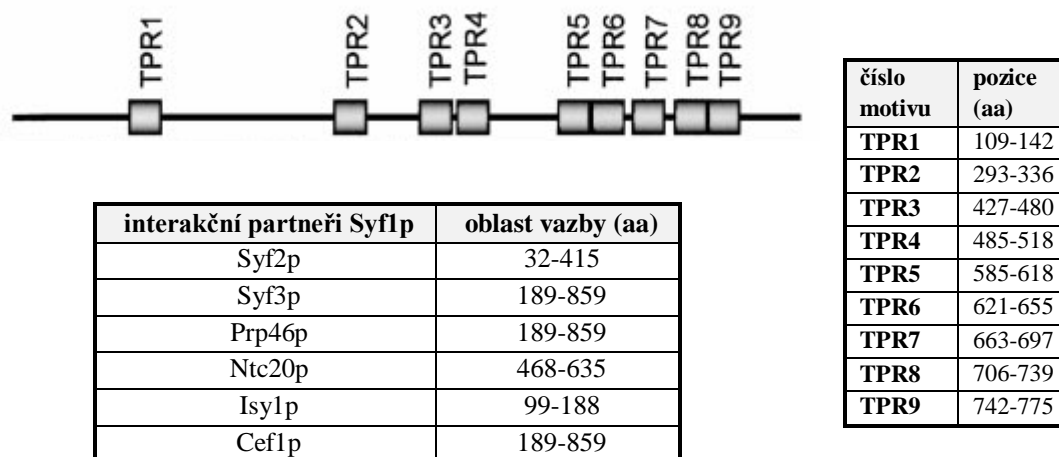
5.2 Asociace Prp45p s komplexem NTC a jejich vzájemné propojení

Posledními čtyřmi interakčními partnery *prp45(1-169)* jsou mutace v genech *SYF1*, *SYF3*, *CEF1* a *NTC20* (viz. tab. 5.1). Všechny uvedené geny, respektive jejich proteinové produkty, tvoří podjednotky komplexu NTC, který je vázán k spliceosomu po disociaci U1 a U4 snRNP, zůstává asociován po oba kroky a následně byl objeven v postsestřihovém komplexu s intronem (Tarn *et al.*, 1994). Prp45p byl označen jako faktor asociující s komplexem NTC a nově získané syntheticky lethální interakce zmíněnou skutečnost potvrzují (Ohi *et al.*, 2002; Gavin *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003). Pro žádný z nalezených mutantních klonů nebyla pro tuto chvíli uskutečněna identifikace syntheticky lethální mutace/mutací s *prp45(1-169)*, a proto o charakteru genetického vztahu lze pouze zběžně uvažovat.

5.2.1 Proteiny Syf1 a Syf3 tvoří kostru spliceosomu

Faktory Syf1p (Ntc90) a Syf3p (Clf1, Ntc77) byly získány při studii zaměřené na hledání syntheticky lethálních partnerů delece *prp17Δ (cdc40)*, synthetic lethal

with cdc forty (Ben-Yehuda *et al.*, 2000b). Gen *SYF3* (*CLF1*; crooked neck-like factor) byl objeven již o rok dříve jako ortholog genu *crn* *D. melanogaster* (Chung *et al.*, 1999). Oba proteiny představují esenciální faktory, které se podílejí obdobně jako Prp17p na sestřihu pre-mRNA i regulaci buněčného cyklu, zejména pak G2/M přechodu (Russell *et al.*, 2000). Pro Syf3p byla prokázána také role během pozdní G1 fáze při iniciaci replikace DNA (Zhu *et al.*, 2002).

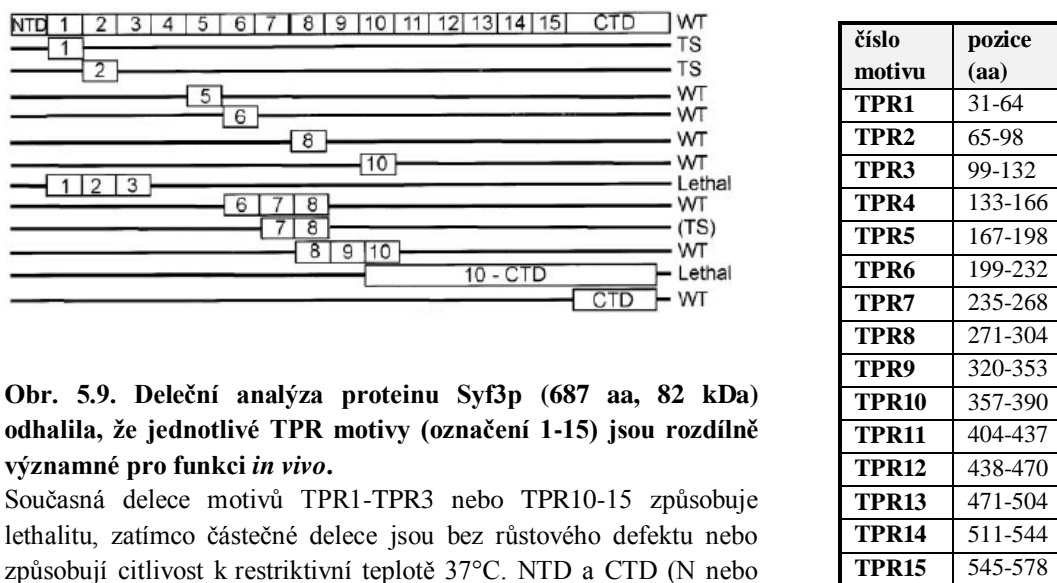


Obr. 5.8. Schematické zjednodušené znázornění struktury proteinu Syf1 (859 aa, 100 kDa), přehled pozic jednotlivých TPR motivů a interakčních partnerů.

Nalezené minimální oblasti proteinu Syf1, které jsou důležité pro interakci s vazebnými partnery, byly stanoveny dvouhybridní studií využívající deleční varianty testovaných proteinů (shrnutí dle Ben-Yehuda *et al.*, 2000a; Ohi a Gould, 2002).

Jedná se o evolučně konzervované faktory strukturně velmi podobné a obsahující několik tetratricopeptidových motivů (délka 34 aa, TPR: multiple crooked neck-like tetratricopeptide repeat motif), které pokrývají velkou část proteinu (Zhang *et al.*, 1991). Trojrozměrná struktura motivů je jednoduchá, jedná se o konfiguraci helix-turn-helix. Syf3p nese 15 TPR motivů, protein Syf1 má celkem 9 kopií (Chung *et al.*, 1999). Předpokládá se, že proteiny s opakujícím se TPR vazebným motivem utváří v rámci spliceosomu kostru pro vazbu faktorů nebo představují „cochaperony“, které pomáhají při uspořádání sestřihového komplexu. Jednotlivé TPR motivy slouží patrně jako přesně časově i prostorově organizující a spojovací části spliceosomu. Pro Syf3p byli identifikováni partneři, kteří se váží k uvedeným motivům napříč oběma sestřihovými kroky, počínaje faktory asociovanými s U1 snRNP a konče procesem, kdy dochází k uvolnění mRNA (viz. tab. 5.3). Ačkoliv Syf3p je součástí komplexu NTC, zdá se, že je vyvazován daleko dříve, než se váží zbylé podjednotky. Faktor

Syf3p se podílí na asociaci U4/U6.U5 tri-snRNP se spliceosomem a zřejmě po uvolnění U1 a U4 snRNP i na následném vyvázání komplexu NTC, který posléze stabilizuje interakci U5 a U6 snRNP s pre-mRNA (Chung *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2003; Chan *et al.*, 2003; Chan a Cheng, 2005). Syf3p neinteraguje přímo s centrálním faktorem komplexu NTC Prp19p, ale prostřednictvím proteinu Cef1 (Tsai *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2002).



Obr. 5.9. Deleční analýza proteinu Syf3p (687 aa, 82 kDa) odhalila, že jednotlivé TPR motivy (označení 1-15) jsou rozdílně významné pro funkci *in vivo*.

Současná delece motivů TPR1-TPR3 nebo TPR10-15 způsobuje lethality, zatímco částečné delece jsou bez růstového defektu nebo způsobují citlivost k restriktivní teplotě 37°C. NTD a CTD (N nebo C-terminal domains) oblasti tvoří krajní úseky proteinu bez TPR motivů (Vincent *et al.*, 2003).

fáze sestřihu	interakční partneři Syf3p	oblast vazby (aa)	TPR
komplex NTC	Syf2p	372-516	TPR11
	Isy1p	11-146 a 224-516	TPR11
	Prp46	11-243	
	Cef1p	11-156	~TPR1, TPR2
	Ntc20p	283-616	TPR11
1 krok sestřihu	Mud2p	~1-355	~TPR9, TRP2
	Prp40p	-	~TPR9-10
	Hsh155p	-	~TPR1, TPR2
	Snu114p	-	~TPR1, TPR2
2 krok sestřihu	Prp45p	35-156	
	Prp22p	628-687	CTD

Tab. 5.3. Přehled vazebných partnerů Syf3p, které se účastní sestřihu pre-mRNA.

Interakční oblasti pro Prp46p a Prp45p se částečně překrývají a je možné, že protein Syf3 může asociovat nepřímo s Prp45p a/nebo Prp46p, případně mohou uvedené faktory vázat Syf3p kooperativně. Minimální vazebné oblasti nezbytné pro interakci byly analyzovány dvouhybridními studiemi (shrnuto dle Chung *et al.*, 1999; Ben-Yehuda *et al.*, 2000a; Albers *et al.*, 2003).

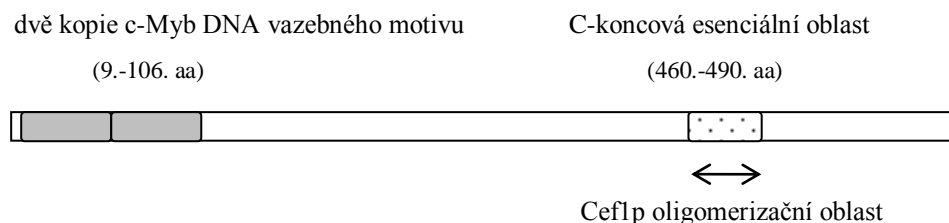
5.2.2 Cef1p je esenciálním faktorem pro funkci komplexu NTC

Cef1p (Ntc85) byl objeven při identifikaci podjednotek komplexu NTC a později také jako orthologní zástupce proteinu Cdc5 *S. pombe*, jenž sdílí homologii s DNA vazebnou doménou savčího protoonkogenu c-Myb (Ohi *et al.*, 1998; Tsai *et al.*, 1999). Společným znakem všech představitelů rodiny proteinů podobných Myb (family of Myb-related proteins) je přítomnost dvou kopií c-Myb DNA vazebného motivu na N-konci (Ohi *et al.*, 1998). Cef1p je esenciálním faktorem sestřihu pre-mRNA *in vitro* i *in vivo* (Tsai *et al.*, 1999). Nepostradatelnost Cef1p byla stanovena i pro průběh buněčného cyklu, hlavně pro rozhraní fází G2/M (Ohi *et al.*, 1998). Protein Snt309 stabilizuje tetramerní konformaci Prp19p a vytváří vazebné místo pro Cef1p, který je posléze vázán k U-boxu Prp19p (Ohi a Gould, 2002; Ohi *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 1998). Centrální protein komplexu NTC Prp19 interaguje pouze se třemi proteiny, Cef1p, Snt309p a Cwc2p, zbylí představitelé jsou asociováni výhradně vazbou s Cef1p. Z výsledků studie z roku 1998 je také patrné, že Cef1p zprostředkovává počáteční asociaci komplexu NTC se spliceosomem (Ohi *et al.*, 1998). Vzhledem k předešlým znalostem, které označují protein Syf3 jako odpovědný faktor za vyvázání komplexu NTC, je pravděpodobné, že Cef1p interaguje právě se Syf3p během tohoto procesu. Pro Cef1p byla zjištěna schopnost dimerizace a oblast odpovědná za oligomerizaci se překrývá s vazebným místem Prp19p (Tsai *et al.*, 1999). Protein Cef1 je vázán v monomerní konformaci při asociaci s tetramerní strukturou Prp19p (Ohi *et al.*, 2005). Předpokládá se, že dochází k vzájemné kompetici Prp19p a Cef1 ve vazbě k interakčnímu místu, a zmíněná vlastnost je tedy zřejmě regulačním mechanismem funkce uvedeného faktoru NTC. Na stabilizaci vazby Cef1p-Prp19p se zřejmě podílí protein Snt309, který představuje neesenciální sestřihový faktor, ale jeho delece způsobuje citlivost ke zvýšené kultivační teplotě 37°C (Chen *et al.*, 1998 a 1999).

5.2.3 Ntc20p se podílí na regulaci proteinu Syf1

Ntc20p (140 aa, 16 kDa) byl nalezen pouze v *S. cerevisiae*, v *S. pombe* byly vypátrány dva proteiny s velmi slabým rozsahem homologie a u vyšších eukaryot nebyl odhalen žádný ani částečně podobný zástupce (Chen *et al.*, 2001). Při zrušení exprese Ntc20p nedochází k růstovým defektům, ale při dvojité deleci *ntc20Δisy1Δ* nastává akumulace nesestřižené pre-mRNA *in vitro* (Chen *et al.*, 2001). Ntc20p je

tedy neesenciální protein a pravděpodobně částečně funkčně zastupitelný s Isy1p (Ntc30p), neboť jejich interakční partneři jsou téměř identičtí.



interakční partneři Cef1p	oblast vazby (aa)
Syf1p	138-392
Syf2p	314-478
Syf3p	360-393
Prp46p	427-590
Ntc20p	283-616
Isy1p	138-479
Prp19p	443-515

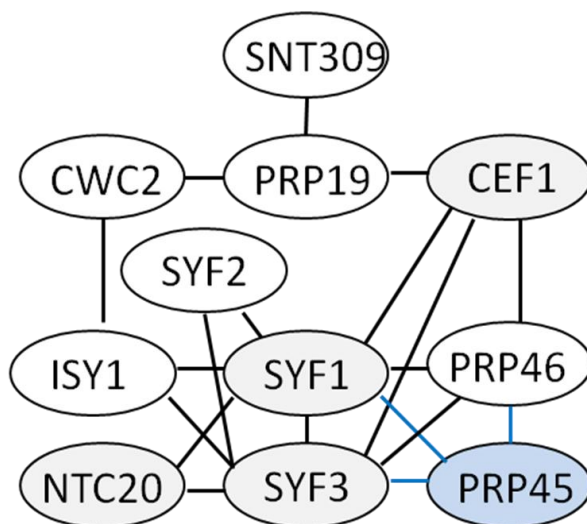
Obr. 5.10. Schematické znázornění struktury proteinu Cef1 (590 aa, 68 kDa) a přehled interakčních partnerů.

Pro buněčný růst je vyžadována přítomnost c-Myb DNA vazebného motivu a krátkého úseku v C-koncové části proteinu. Tabulka obsahuje přehled vazebných partnerů a minimální nezbytné oblasti Cef1p odpovědné za asociaci, analyzováno na základě dvouhybridních interakcí (shrnuje dle Tsai *et al.*, 1999; Ben-Yehuda *et al.*, 2000a; Ohi a Gould, 2002).

5.2.4 Vztah Prp45p k faktorům komplexu NTC

Vzhledem k množství interakcí proteinů Syf1 a Syf3 v rámci komplexu NTC je možno tvrdit, že zmíněné faktory, které obsahují TPR vazebné motivy, představují centrální „lešení“ sestřihového komplexu. Syf3p je vázán k spliceosomu před vstupem zbylých podjednotek komplexu NTC, které jsou pravděpodobně drženy dohromady druhým z faktorů, Syf1p. V rámci komplexu NTC je přítomem subkomplex tvořený esenciálními proteiny Syf1 a Cef1, které jsou asociovány dohromady faktory Isy1p a Syf2p. Proteiny Isy1, Ntc20 a Syf2 se nejspíše podílí na regulaci Syf1p. Jak již bylo řečeno dříve, delece *ntc20Δisy1Δ* oslabuje buněčný růst a dodatečné vyřazení z funkce i proteinu Syf2 způsobí smrt buňky. Nadprodukce Syf1p je schopna zčásti potlačit růstový defekt buněk nesoucích *ntc20Δisy1Δ* (Chen *et al.*, 2002). Prostřednictvím Cef1p je zmiňovaný subkomplex vázán k centrálnímu

proteinu Prp19 a tedy i komplexu NTC. Z hlediska vztahu synthetické lethality *prp45(1-169)* s mutacemi v genech *SYF1*, *SYF3*, *CEF1* a *NTC20* lze očekávat, že mohlo dojít k narušení některých vzájemných interakcí, které jsou odpovědné za udržování struktury subkomplexu a posléze i komplexu NTC. Pro Syf1p a Syf3p byla analyzována i přímá vazba s proteinem Prp45, ačkoliv v případě Syf1p se jedná nejspíše o velice slabou interakci (Albers *et al.*, 2003). Pro Syf1p ani Syf3p nebyla blíže charakterizována vazebná oblast na Prp45p, proto nelze určit, zda v buňkách s *prp45(1-169)* je jejich interakce zachována. V roce 2002 byli identifikováni TAP metodou nejbližší interakční partneři Cef1p a některých dalších proteinů komplexu NTC. Kromě většiny představitelů s Prp19 asociovaného komplexu a některých snRNP byly získány i faktory např. Prp45p, Prp8p, Prp17p, Prp22p a Slu7p (Ohi *et al.*, 2002; Gavin *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003). Funkční propojení proteinů komplexu NTC a ostatních faktorů sestřihu není příliš objasněno a znalost mutací u výše zmíněných zástupců syntheticky lethálních s *prp45(1-169)* jistě pomůže snazšímu porozumění vzájemných vztahů uvnitř spliceosomálního komplexu. Protein Prp45p vstupuje do sestřihu ve fázi podobné komplexu NTC, vytvořené mutace mohly oslabit počáteční interakci Prp45p se spliceosomem nebo narušit kompaktní strukturu komplexu NTC asociovaného právě s Prp45p.



Obr. 5.11. Vzájemné interakce nejvýznamnějších podjednotek komplexu NTC a proteinu Prp45. Znázorněny jsou přímé fyzické vztahy analyzované dvouhybridními studiemi. Šedivě jsou označeny faktory, jejichž mutované alely byly získány v této práci ve vztahu synthetické lethality s *prp45(1-169)* (shrnutí dle Dix *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1999; Tsai *et al.*, 1999; Ben-Yehuda *et al.*, 2000a; Ohi a Gould, 2002; Chen *et al.*, 2002).

Faktor Syf3p představuje fyzického i genetického interakčního partnera nejenom Prp45p, ale i RNA helikázy Prp22p. Přímý interakční vztah spojuje všechny tři uvedené proteiny, Syf3p, Prp22 a Prp45 (Albers *et al.*, 2003). Oblast vazby Prp22p k Syf3 proteinu byla stanovena na minimální nezbytný úsek 628.-687. aminokyselinového zbytku nacházejícího se mimo TPR region v neesenciální C-koncové části proteinu (Vincent *et al.*, 2003). Proto se kromě stabilizace asociace Prp22p se spliceosomem neočekává významnější role Syf3p ve vztahu k regulaci případně iniciálnímu vyvazování této helikázy k sestřihovému komplexu (Albers *et al.*, 2003; Vincent *et al.*, 2003).

5.3 Vztah faktorů sestřihu pre-mRNA k buněčnému cyklu

Buněčný cyklus a sestřih pre-mRNA představují zcela rozdílné buněčné procesy, přesto bylo v *S. cerevisiae* a *S. pombe* nalezeno několik genů podílejících se na obou významných dějích. Cdc fenotyp (cell division cycle) objevený u některých sestřihových faktorů může být zapříčiněn nefunkčním sestřihem malé skupiny genů obsahujících specifický intron (suboptimální), jejichž proteinové produkty se zřejmě účastní regulace průchodu buněčným cyklem (Burns *et al.*, 2002; Kaplan a Kupiec, 2006). Mezi tyto geny se řadí např. *TUB1* a *TUB3*. Jedná se o příbuzné isogeny s 90% identitou, které jsou vzájemně funkčně zastupitelné a kódují tubulín α (shrnutí v Winsor a Schiebel, 1997).

U buněk nesoucích mutace v některých sestřihových genech (např. *prp22-1*, *prp17 Δ* , *prp18* a *slu7-1*) dochází k defektu sestřihu pre-mRNA kódujících geny *TUB1* a *TUB3*, který vede ke snížené hladině tubulínu α (Burns *et al.*, 2002; Chawla *et al.*, 2003). Změnu poměru množství tubulínu α k hladině tubulínu β (kódován genem *TUB2*, s tubulínem α tvoří heterodimer) působí některá závažná buněčná poškození. Mutace sestřihových faktorů zapříčiňují obvykle nedostatečnou tvorbu mitotického spindlu (blok buněčného cyklu nejčastěji na rozhraní fáze G₂/M), citlivost ke zvýšené kultivační teplotě a k některým mikrotubulárním inhibitorům (př. benomyl, nocodazol). Velmi podobný fenotyp vykazují i mutace v substrátových genech *TUB1* nebo *TUB3* (Richards *et al.*, 2000). Odstranění intronu z *TUB1* genu (*tub1 Δ i*) vede zpravidla k obnovení buněčného cyklu a částečnému potlačení růstového defektu u buněk, které obsahují některé z uvedených mutací v sestřihových faktorech (Burns *et al.*, 2002; Chawla *et al.*, 2003).

Na základě výsledku microarrays buněk exprimujících *PRP45* a *prp45(1-169)* byla stanovena nižší míra exprese pro geny *TUB1* i *TUB3* u buněk s C-koncovou delecí. Mutace *prp45(1-169)* způsobuje citlivost k teplotě 37°C a inhibitoru nocodazolu a z morfologického hlediska dochází ke vzniku buněk s výrazně prodlouženými pupeny (viz. kap. 2.2, Literární úvod; Gahura *et al.*, přijato do tisku). V naší laboratoři byl připraven kmen s mutací *prp45(1-169)* nesoucí gen *TUB1* bez intronu (*tub1Δi*). Odstranění intronu však nemělo výrazný vliv na změnu hladiny tubulínu α ani na potlačení citlivosti ke zvýšené kultivační teplotě 37°C nebo na defekt buněčného dělení. Došlo pouze k nepatrnému snížení citlivosti k mikrotubulárnímu inhibitoru nocodazolu. Zdá se, že intron v genu *TUB1* není odpovědný za fenotypové projevy mutace *prp45(1-169)*.

5.3.1 Genetický vztah mutace genu *COF1* s *prp45(1-169)*

Syntheticky lethální stav *prp45(1-169)* s genem *COF1* byl nalezen celkem u dvou mutantních klonů (viz. tab. 5.1). Mutace odpovědné za syntheticky lethální stav nebyly prozatím analyzovány, ale její identifikace bude jistě velmi přínosná pro hlubší pochopení vzájemného genetického vztahu.

Celkem lze očekávat dvě možnosti umístění mutace/mutací. První alternativa představuje vznik aminokyselinové záměny v některé z funkčních oblastí esenciálního proteinu Cof1. Výsledky microarrays z buněk exprimujících divokou a mutovanou alelu *PRP45* nepotvrdily pro nižší míru exprese, proto zmíněné fenotypové projevy mutace *prp45(1-169)* s největší pravděpodobností nesouvisí s genem *COF1*. Generovaná mutace však mohla v kombinaci s narušenými buněčnými procesy v mutovaných buňkách s *prp45(1-169)* vyústit v lethaltu. Proteiny Cof1 a Pfy1 spolu funkčně velmi významně souvisí a účastní se regulace metabolismu aktinu *S. cerevisiae*. Pro gen *PFY1* byla potvrzena nižší míra exprese v přítomnosti *prp45(1-169)* a představuje tedy významného kandidáta, jehož narušená hladina proteinového produktu může souviset s fenotypem mutovaných buněk.

Druhá potenciální oblast nesoucí mutaci je intronový úsek a zejména jeho konzervované sekvence. Cofilin obsahuje intron délky 179 nukleotidů. Vzdálenost mezi branchpoint a 3'sestřihovým místem dosahuje poměrně dlouhé vzdálenosti 133 nukleotidů vyskytující se v *S. cerevisiae* velmi řídce (Spingola *et al.*, 1999; Ares lab Yeast Intron Database, www.soe.ucsc.edu/research/compbio/yeast_introns.html).

Protein Prp45 se podílí převážně na průběhu druhého kroku sestřihu (Gahura *et al.*, přijato do tisku). Oblast 3'sestřihového místa a okolní sekvence není nikterak zvláštní, naopak před konzervovaným dinukleotidem AG je přítomen nejčastěji se vyskytující uridylát, UAG (Spingola *et al.*, 1999). Ozařováním generovaná mutace mohla způsobit záměnu některého nukleotidu v uvedené oblasti intronu a vyústit k lethalitě v kombinaci s mutací v sestřihovém faktoru Prp45p. Ze studií průběhu sestřihu *in vivo* u buněk *prp45(1-169)* je známo, že přítomnost neobvyklých konsensus sekvencí např. GAG narušuje efektivnost sestřihu druhého kroku (viz. kap. 2.3.6, Literární úvod; Gahura *et al.*, přijato do tisku). Vytvořená mutace však může být situována i v některé jiné části intronu, kde může oslabovat např. vazbu některého spliceosomálního faktoru, případně dávat vznik alternativnímu sestřihovému místu nebo alternovat branchpoint.

5.3.2 Regulace aktinového cytoskeletu *S. cerevisiae*

Hlavní komponentu mikrofilamet představuje aktin, který asociuje s některými dalšími proteiny, s nimiž společně tvoří velmi organizované cytoskeletární uspořádání. Role aktinového cytoskeletu je spojena zejména s procesy zahrnujícími tvorbu pupene, polarizovaný růst buněk, integritu buněčné stěny, sekreci a endocytózu (shrnutí v Winsor a Schiebel, 1997). Mikrofilamenta jsou tvořena vzájemně vázanými helikálními řetězci a u kvasinek vytváří dva základní typy struktur, cytoplasmatic cables a cortical patches. Cables sestávají z podélných svazků aktinových mikrofilament a patches představují kotvící struktury, které jsou formovány navinutím aktinových mikrofilament kolem invaginované membrány (Pruyne a Bretscher, 2000).

Aktin (gen *ACT1*, 375 aa, 42 kDa) je esenciální protein s ATPázovou aktivitou, který se vyskytuje jako tzv. G aktin (monomerní) nebo polymerovaný ve formě F aktinu (Pruyne a Bretscher, 2000). Aktinová mikrofilamenta představují dynamické struktury schopné růstu na obou koncích. Rychleji rostoucí konec je značen + (barbed end), druhý – (pointed end). Polymerace je časově i prostorově specificky řízený děj, kterého se účastní actin-binding proteins (ABPs). Do uvedené kategorie proteinů náleží i faktory profilin a cofilin.

Profilin (gen *PFYI*, 126 aa, 14 kDa) je esenciálním multifunkčním proteinem, který mimo jiné váže polyprolinové oblasti proteinů a PIP2 (fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát) v plazmatické membráně, čímž je schopen na základě signalizace regulovat organizaci aktinu v určité oblasti buňky (Winsor a Schiebel, 1997). Pro Pfy1p je charakteristická asociace s monomerním aktinem vázaným s ADP a příslušný interakční povrch se nachází v odlišné části proteinu než nukleotid vazebná štěrbina. Profilin aktivuje výměnu ADP za ATP vázaných na aktinových monomerech a poté zprostředkovává jejich vazbu na + konec mikrofilamenta (Wolven *et al.*, 2000). Regulace aktivity profilinu je řízena neschopností interagovat s monomerním aktinem při asociaci s PIP2 (překryv vazebných povrchů pro aktin a PIP2).

Při náhlé změně kultivační teploty z 30°C na 37°C udržuje profilin identickou hladinu aktinových filament (Yeh a Haarer, 1996). Delece genu *PFYI* způsobuje kromě náhodné lokalizace aktinu také citlivost ke zvýšené kultivační teplotě, zpomalení růstu a defekty buněčného tvaru. Dále byl pozorován vznik mnohojaderných větších buněk, dochází k nerovnoměrnému rozmístění chitinu v buněčné stěně a abnormálnímu formování pupenů (shrnutí v Haarer *et al.*, 1990).

Esenciální protein cofilin/ADF (actin depolymerizing factor; gen *COF1*, 143 aa, 16 kDa) se vyskytuje především v oblastech cortical patches. Cofilin váže s vysokou afinitou podjednotky aktinu v mikrofilamentu, které prodělaly hydrolyzu ATP na ADP, zvláště tedy – konce. Je však schopen asociovat i s globulárním aktinem. Vazbou přes dvě podjednotky aktinu zkracuje strukturu mikrofilamenta a vystavuje tak větší část jeho povrchu vazbě dalších proteinů cofilinu, které se vmezeří mezi aktinové podjednotky a zprostředkovávají jejich následné uvolnění (Moon a Drubin, 1995). Nejdůležitější funkcí cofilinu je tedy odštěpování malých úseků mikrofilament, které generují aktuální vyšší počet – konců, což zvyšuje dynamiku odbourávání. Uvolněné podjednotky aktinu s navázaným ADP jsou dále upravovány profilinem a posléze polymerovány do jiných částí aktinového cytoskeletu. Aktivita cofilinu je regulována změnou lokálního pH a pozitivní vliv mají hodnoty nad 7,5. Fosforylace serinu v N-koncové části proteinu má negativní vliv na funkci, protože se v této oblasti nachází místo odpovědné za vazbu k aktinu. Obdobně jako v případě profilinu se i na regulaci cofilinu podílí fosfoinositidy (hlavně PIP2), jejichž interakční místo se opět překrývá s místem pro vazbu aktinu (shrnutí v Ono, 2003).

Jak již bylo řečeno dříve, v buňkách *prp45(1-169)* nastává snížení exprese proteinu profilin. Za předpokladu aminokyselinové záměny na některé významné pozici proteinu Cofil nebo nižší míře jeho exprese vyvolané i prostřednictvím mutace v intronové oblasti, lze očekávat při souhrě všech tří mutovaných genů vznik velmi závažného růstového defektu. Při delecí genu *PFYI* vzniká velmi podobný fenotypový projev identifikovaný u buněk s mutací *prp45(1-169)*, viz. kap. 2.3.6, Literární úvod.

Cofilin narušuje dynamickou rovnováhu aktinu ve prospěch zvýšení poměru ADP k ATP. V buňce se dočasně hromadí aktinové podjednotky asociované s ADP neschopné se vázat k mikrofilamentům. Funkční rolí profilinu je opětovné navrácení stavu do rovnováhy zprostředkované výměnou ADP za ATP a případné opětovné vyvázání aktinových podjednotek do mikrofilament. Proces polymerace a depolymerace probíhá *in vivo* i samovolně, ale reakční rychlost je velmi pomalá. V buňkách s nižší hladinou profilinu postupují přestavby aktinového cytoskeletu výrazně pomaleji a při narušení funkce cofilinu může dojít k dalším závažným poškozením eventuálně i neslučitelným s životem.

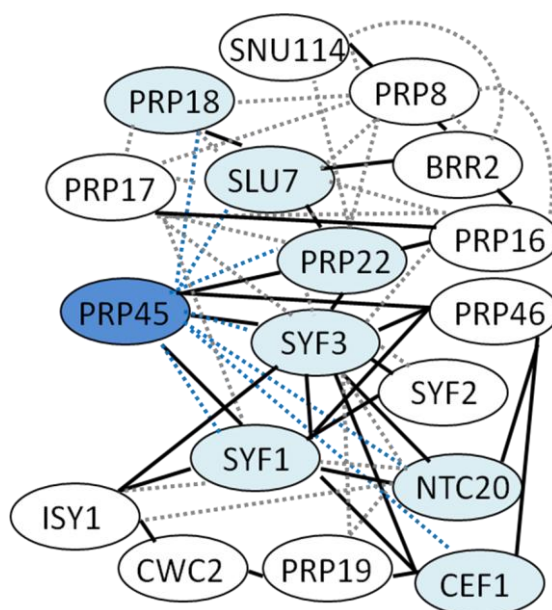
6. Závěr

Prostřednictvím studie zabývající se genetickými interakcemi bylo identifikováno celkem osm genů nesoucích mutace syntheticky lethální s *prp45(1-169)*. V sedmi případech se jedná o geny, jejichž proteinové produkty se účastní sestřihu pre-mRNA, *SLU7*, *PRP18*, *PRP22*, *SYF1*, *SYF3*, *CEF1* a *NTC20*, a posledním nalezeným genetickým interakčním partnerem je gen *COF1*.

Proteiny Slu7, Prp18 a Prp22 představují důležité účastníky druhého sestřihového kroku. K jejich specifickým vlastnostem lze přiřadit např. výběr řádného 3'sestřihového místa nebo nepostradatelnost pro průběh druhého kroku při vzdálenosti delší než sedm nukleotidů mezi branchpoint a 3'sestřihovým místem. Společnou vlastností Slu7p a/nebo Prp45p je vyvázání proteinu Prp22 ke katalytickému centru sestřihového komplexu případně regulace funkce této helikázy. Prp22p se podílí na kontrole správného průběhu druhé transesterifikační reakce a uvolňuje sestřiženou mRNA ze spliceosomu.

Zbývající geny, *SYF1*, *SYF3*, *CEF1* a *NTC20*, respektive jejich proteinové produkty, tvoří komponenty komplexu NTC přítomného sestřihu oba katalytické kroky. Tento čistě proteinový komplex patří v posledních letech k nejvíce studovaným komponentám sestřihu. K bližšímu pochopení jeho strukturního uspořádání a jednotlivých interních vztahů velmi významně přispějí i znalosti syntheticky lethálních mutací u genů, které byly získány v této diplomové práci.

Pro gen *COF1* byly nalezeny celkem dvě mutantní alely ve vztahu synthetické lethality s *prp45(1-169)* a vzhledem ke skutečnosti, že identifikace mutace nebyla prozatím uskutečněna, je stanovení příčiny genetického vztahu poněkud obtížné. Mutací způsobená aminokyselinová záměna v proteinu Cof1 by mohla zapříčinit lethality ve spojitosti s proteinem Pfy1, jehož exprese je snížena v přítomnosti *prp45(1-169)*. Přítomnost mutace v intronové oblasti by naopak mohla potvrzovat esencialitu proteinu Prp45 pro sestřih pre-mRNA *in vivo*.



Obr. 6.1. Znázornění interakcí mezi nejvýznamnějšími proteiny účastnícími se druhého kroku sestřihu pre-mRNA, některými faktory komplexu NTC a Prp45p.

Přímé interakce identifikované dvouhybridní analýzou jsou znázorněny plnou čarou. Genetické interakce jsou označeny čarou přerušovanou (modře jsou zvýrazněny interakce nalezené v této diplomové práci). Shrnuto dle dostupných informací z *Saccharomyces Genome Database*, www.yeastgenome.org.

7. Souhrn

- Byl připraven kmen AVY11 opačného párovacího typu ke kmeni FPY4B.
- Náhodnou mutagenezí bylo nalezeno 16 mutantních klonů odvozených od kmene FPY4B a 25 pocházejících od kmene AVY11, které jsou závislé na plazmidu pOG02.
- U získaných klonů byl vyloučen dominantně negativní projev mutantní alely a pro deset klonů byla zjištěna citlivost ke zvýšené kultivační teplotě 37°C.
- Na základě rozdělení mutantních klonů do komplementačních skupin bylo nalezeno pět skupin o dvou a více zástupcích.
- Pro 15 mutantních klonů odvozených kmene FPY4B a 18 pocházejících od kmene AVY11 bylo stanoveno, že syntetická lethality, kterou vykazují, je vázána na mutaci *prp45(1-169)*.
- Transformací buněk plazmidy nesoucími geny, které byly vybrány jako potenciální genetičtí interakční partneři *PRP45*, bylo identifikováno celkem šest genů, které suprimují synteticky lethální stav, *SYF3*, *SLU7*, *PRP22*, *SYF1*, *CEF1* a *PRP18*.
- Transformací genomovou knihovnou se podařilo určit gen *COF1* u klonu AVY11 #31 a *NTC20* u AVY11 #36. Gen *COF1* je schopen potlačit synteticky lethální stav i u klonu FPY4B #7, který představuje komplementačního partnera AVY11 #31.
- Z genomu klonů AVY11 #28, #30 a #38 byla izolována alela genu *PRP22* a její sekvence analyzována. Alela klonu #30 nese tři záměny, které způsobují substituce aminokyselin na pozicích R300P, Q301P, L302I v konzervované oblasti. Pro klony #28 a #38 nebyla mutace v oblasti ORF identifikována.

8. Seznam literatury

Abovich N, Liao XC, Rosbash M. The yeast MUD2 protein: an interaction with PRP11 defines a bridge between commitment complexes and U2 snRNP addition. *Genes Dev.* **8** (7):843-54, 1994.

Achsel T, Brahms H, Kastner B, Bachi A, Wilm M, Luhrmann R. A doughnut-shaped heteromer of human Sm-like proteins binds to the 3'-end of U6 snRNA, thereby facilitating U4/U6 duplex formation in vitro. *EMBO J.* **18** (20):5789-802, 1999.

Albers M, Diment A, Muraru M, Russell CS, Beggs JD. Identification and characterization of Prp45p and Prp46p, essential pre-mRNA splicing factors. *RNA.* **9** (1):138-50, 2003.

Ambrozková M, Půta F, Fuková I, Skružný M, Brábek J, Folk P. The fission yeast ortholog of the coregulator SKIP interacts with the small subunit of U2AF. *Biochem Biophys Res Commun.* **284** (5):1148-54, 2001.

Arenas JE, Abelson JN. Prp43: An RNA helicase-like factor involved in spliceosome disassembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94** (22):11798-802, 1997.

Aronová A, Bačíková D, Crotti LB, Horowitz DS, Schwer B. Functional interactions between Prp8, Prp18, Slu7, and U5 snRNA during the second step of pre-mRNA splicing. *RNA.* **13** (9):1437-44, 2007.

Bačíková D, Horowitz DS. Mutational analysis identifies two separable roles of the *Saccharomyces cerevisiae* splicing factor Prp18. *RNA.* **8** (10):1280-93, 2002.

Bačíková D, Horowitz DS. Genetic and functional interaction of evolutionarily conserved regions of the Prp18 protein and the U5 snRNA. *Mol Cell Biol.* **25** (6):2107-16, 2005.

Bartels C, Urlaub H, Luhrmann R, Fabrizio P. Mutagenesis suggests several roles of Snu114p in pre-mRNA splicing. *J. Biol. Chem.* **278**: 28324–4, 2003.

Bassler J, Grandi P, Gadal O, Lessmann T, Petfalski E, Tollervey D, Lechner J, Hurt E. Identification of a 60S preribosomal particle that is closely linked to nuclear export. *Molecular Cell* **8**:517–529, 2001.

Basson ME, Moore RL, O'Rear J, Rine J. Identifying mutations in duplicated functions in *Saccharomyces cerevisiae*: recessive mutations in HMG-CoA reductase genes. *Genetics* **117**:645–55, 1987.

Baudin A, Ozier-Kalogeropoulos O, Denouel A, Lacroute F, Cullin C. A simple and efficient method for direct gene deletion in *S. cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **21** (14):3329-30, 1993.

Baudino TA, Kraichely DM, Jefcoat SC Jr, Winchester SK, Partridge NC, MacDonald PN. Isolation and characterization of a novel coactivator protein, NCoA-62, involved in vitamin D mediated transcription. *J Biol Chem.* **273** (26):16434-41, 1998.

Bellare P, Kutach AK, Rines AK, Guthrie C, Sontheimer EJ. Ubiquitin binding by a variant Jab1/MPN domain in the essential pre-mRNA splicing factor Prp8p. *RNA* **12** (2): 292–302, 2006.

Ben-Yehuda S, Dix I, Russell CS, McGarvey M, Beggs JD, Kupiec M. Genetic and physical interactions between factors involved in both cell cycle progression and pre-mRNA splicing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **156** (4):1503-17, 2000a.

Ben-Yehuda S, Russell CS, Dix I, Beggs JD, Kupiec M. Extensive genetic interactions between PRP8 and PRP17/CDC40, two yeast genes involved in pre-mRNA splicing and cell cycle progression. *Genetics.* **154** (1):61-71, 2000b.

Berglund, JA, Abovich N, Rosbash M. A cooperative interaction between U2AF65 and mBBP/SF1 facilitates branchpoint region recognition. *Genes Dev.* **12**:858–867, 1998.

Boeke JD, Trueheart J, Natsoulis G, Fink GR. 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol.* **154**:164–75, 1987.

Brenner TJ, Guthrie C. Genetic analysis reveals a role for the C terminus of the *Saccharomyces cerevisiae* GTPase Snu114 during spliceosome activation. *Genetics.* **170** (3):1063–80, 2005.

Brenner TJ, Guthrie C. Assembly of Snu114 into U5 snRNP requires Prp8 and a functional GTPase domain. *RNA* **12** (5): 862–71, 2006.

Bres V, Gomes N, Pickle L, Jones KA. A human splicing factor, SKIP, associates with P-TEFb and enhances transcription elongation by HIV-1 Tat. *Genes Dev.* **19**:1211–1226, 2005.

Brown JD, Beggs JD. Roles of PRP8 protein in the assembly of splicing complexes. *EMBO J.* **11** (10):3721–9, 1992.

Brys A, Schwer B. Requirement for SLU7 in yeast pre-mRNA splicing is dictated by the distance between the branchpoint and the 3' splice site. *RNA.* **2** (7):707–17, 1996.

Burgess SM, Guthrie C. A mechanism to enhance mRNA splicing fidelity: the RNA-dependent ATPase Prp16 governs usage of a discard pathway for aberrant lariat intermediates. *Cell.* **73** (7):1377–91, 1993.

Burns CG, Ohi R, Mehta S, O'Toole ET, Winey M, Clark TA, Sugnet CW, Ares M Jr, Gould KL. Removal of a single alpha-tubulin gene intron suppresses cell cycle arrest phenotypes of splicing factor mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **22** (3):801–15, 2002.

Campodonico E, Schwer B. ATP-dependent remodeling of the spliceosome: intragenic suppressors of release-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Prp22. *Genetics* **160**: 407–415, 2002.

Collins CA, Guthrie C. Allele-specific genetic interactions between Prp8 and RNA active site residues suggest a function for Prp8 at the catalytic core of the spliceosome. *Genes Dev.* **13** (15):1970–82, 1999.

Collins CA, Guthrie C. The question remains: Is the spliceosome a ribozyme? *Nat Struct Biol* **7**: 850–4, 2000.

Crotti LB, Bacíková D, Horowitz DS. The Prp18 protein stabilizes the interaction of both exons with the U5 snRNA during the second step of pre-mRNA splicing. *Genes Dev.* **21** (10):1204–16, 2007.

Dahl R, Wani B, Hayman MJ. The Ski oncoprotein interacts with Skip, the human homolog of *Drosophila* Bx42. *Oncogene.* **16** (12):1579–86, 1998.

Daignan-Fornier B, Fink GR. Coregulation of purine and histidine biosynthesis by the transcriptional activators BAS1 and BAS2. *Proc Natl Acad Sci USA.* **89**(15):6746–50, 1992.

Davis CA, Grate L, Spingola M, Ares M Jr. Test of intron predictions reveals novel splice sites, alternatively spliced mRNAs and new introns in meiotically regulated genes of yeast. *Nucleic Acids Res.* **28** (8):1700–6, 2000.

Dayyeh ABK, QuanTK, Castro M, Ruby SW. *J. Biol. Chem.* **277**:20221–3, 2002.

de la Cruz J, Kressler D, Linder P. Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends Biochem. Sci.* **24**: 192–198, 1999.

Diehl BE, Pringle JR. Molecular analysis of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome I: identification of additional transcribed regions and demonstration that some encode essential functions. *Genetics* **127**: 287–298, 1991.

Dix I, Russell CS, O'Keefe RT, Newman AJ, Beggs JD. Protein-RNA interactions in the U5 snRNP of *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*. **4** (12):1675-86, 1998.

Fabrizio P, Lagerbauer B, Lauber J, Lane WS, Lührmann R. An evolutionarily conserved U5 snRNP-specific protein is a GTP-binding factor closely related to the ribosomal translocase EF-2. *EMBO J*. **16**: 4092-106, 1997.

Fantappiè MR, Bastos de Oliveira FM, de Moraes Maciel R, Rumjanek FD, Wu W, Loverde PT. Cloning of SmNCoA-62, a novel nuclear receptor co-activator from *Schistosoma mansoni*: assembly of a complex with a SmRXR1/SmNR1 heterodimer, SmGCN5 and SmCBP1. *Int J Parasitol*. **38** (10):1133-47, 2008.

Figueroa JD, Hayman MJ. The human Ski-interacting protein functionally substitutes for the yeast PRP45 gene. *Biochem Biophys Res Commun*. **319** (4):1105-9, 2004.

Folk P, Půta F, Krpejšová L, Blahůšková A, Markoš A, Rabino M, Dottin RP. The homolog of chromatin binding protein Bx42 identified in *Dictyostelium*. *Gene*. **181** (1-2):229-31, 1996.

Folk P, Půta F, Skružný M. Transcriptional coregulator SNW/SKIP: the concealed tie of dissimilar pathways. *Cell Mol Life Sci*. **61** (6):629-40, 2004, Review.

Frank D, Guthrie C. An essential splicing factor, SLU7, mediates 3' splice site choice in yeast. *Genes Dev*. **6** (11):2112-24, 1992.

Frank D, Patterson B, Guthrie C. Synthetic lethal mutations suggest interactions between U5 small nuclear RNA and four proteins required for the second step of splicing. *Mol Cell Biol*. **12** (11):5197-205, 1992.

Gahura O, Abrahámová K, Skružný M, Munzarová V, Valentová A, Folk P, Půta F. SNW1/SKIP co-regulator homolog Prp45 is required for splicing of non-consensus pre-mRNA templates in yeast. *J Cell Biochem*, přijato do tisku.

Gavin AC, Bosche M, Krause R, Grandi P, Marzioch M, Bauer A, Schultz J, Rick JM, et al. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*. **415** (6868):141-7, 2002.

Gelmedin V, Zavala-Góngora R, Fernández C, Brehm K. *Echinococcus multilocularis*: cloning and characterization of a member of the SNW/SKIP family of transcriptional coregulators. *Exp Parasitol*. **111**(2):115-20, 2005.

Giaever G, Chu AM, Ni L, Connelly C, Riles L, Véronneau S, Dow S, Lucau-Danila A, et al. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*. **418** (6896):387-91, 2002.

Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG. Life with 6000 genes. *Science*. **274** (5287):546, 563-7, 1996, Review.

Gorbalenya AE, Koonin EV. Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Curr. Opin. Struct. Biol*. **3**: 419-429, 1993.

Görnemann J, Kotovic KM, Hujer K, Neugebauer KM. Cotranscriptional spliceosome assembly occurs in a stepwise fashion and requires the cap binding complex. *Mol. Cell* **19**:53-63, 2005.

Grainger RJ, Beggs JD. Prp8 protein: at the heart of the spliceosome. *RNA*. **11** (5):533-57, 2005.

Haarer BK, Lillie SH, Adams AE, Magdolen V, Bandlow W, Brown SS. Purification of profilin from *Saccharomyces cerevisiae* and analysis of profilin-deficient cells. *J Cell Biol*. **110** (1):105-14, 1990.

Harris SD, Cheng J, Pugh TA, Pringle JR. Molecular analysis of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome I. On the number of genes and the identification of essential genes using temperature-sensitive-lethal mutations. *J. Mol. Biol* **225**:53–65, 1992.

Hartwell LH. Macromolecule synthesis in temperature-sensitive mutants of yeast. *J Bacteriol.* **93** (5):1662-70, 1967.

Hartwell LH, Culotti J, Pringle JR, Reid BJ. Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science.* **183**(120):46-51, 1974.

Hieter P, Mann C, Snyder M, Davis RW. Mitotic stability of yeast chromosomes: a colony color assay that measures nondisjunction and chromosome loss. *Cell* **40**:381–92, 1985.

Hirose Y, Manley JL. RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes Dev.* **14**: 1415–1429, 2000.

Horowitz DS, Abelson J. A U5 small nuclear ribonucleoprotein particle protein involved only in the second step of pre-mRNA splicing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **13** (5):2959-70, 1993.

Chan SP, Kao DI, Tsai WY, Cheng SC. The Prp19p-associated complex in spliceosome activation. *Science.* **302** (5643):279-82, 2003.

Chan SP, Cheng SC. The Prp19-associated complex is required for specifying interactions of U5 and U6 with pre-mRNA during spliceosome activation. *J Biol Chem.* **280** (35):31190-9. Epub 2005 Jun 30, 2005.

Chanfreau G, Legrain P, Dujon B, Jacquier A. Interaction between the first and last nucleotides of pre-mRNA introns is a determinant of 39 splice site selection in *S. cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **22**:1981–7, 1994.

Chapman KB, Boeke JD. Isolation and characterization of the gene encoding yeast debranching enzyme. *Cell.* **65** (3):483-92, 1991.

Chawla G, Sapra AK, Surana U, Vijayraghavan U. Dependence of pre-mRNA introns on PRP17, a non-essential splicing factor: implications for efficient progression through cell cycle transitions. *Nucleic Acids Res.* **31** (9):2333-43, 2003.

Chen HR, Jan SP, Tsao TY, Sheu YJ, Banroques J, Cheng SC. Snt309p, a component of the Prp19p-associated complex that interacts with Prp19p and associates with the spliceosome simultaneously with or immediately after dissociation of U4 in the same manner as Prp19p. *Mol Cell Biol.* **18** (4):2196-204, 1998.

Chen HR, Tsao TY, Chen CH, Tsai WY, Her LS, Hsu MM, Cheng SC. Snt309p modulates interactions of Prp19p with its associated components to stabilize the Prp19p-associated complex essential for pre-mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96** (10):5406-11, 1999.

Chen S, Anderson K, Moore MJ. Evidence for a linear search in bimolecular 3 splice site AG selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:593–598, 2000.

Chen CH, Tsai WY, Chen HR, Wang CH, Cheng SC. Identification and characterization of two novel components of the Prp19p-associated complex, Ntc30p and Ntc20p. *J Biol Chem.* **276** (1):488-94, 2001.

Chen CH, Yu WC, Tsao TY, Wang LY, Chen HR, Lin JY, Tsai WY, Cheng SC. Functional and physical interactions between components of the Prp19p-associated complex. *Nucleic Acids Res.* **30** (4):1029-37, 2002.

Chen CH, Kao DI, Chan SP, Kao TC, Lin JY, Cheng SC. Functional links between the Prp19-associated complex, U4/U6 biogenesis, and spliceosome recycling. *RNA.* **12** (5):765-74, 2006.

- Chung S, McLean MR, Rymond BC.** Yeast ortholog of the *Drosophila* crooked neck protein promotes spliceosome assembly through stable U4/U6.U5 snRNP addition. *RNA*. **5** (8):1042-54, 1999.
- James SA, Turner W, Schwer B.** How Slu7 and Prp18 cooperate in the second step of yeast pre-mRNA splicing. *RNA*. **8** (8):1068-77, 2002.
- Jiang J, Horowitz DS, Xu RM.** Crystal structure of the functional domain of the splicing factor Prp18. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**(7):3022-7, 2000.
- Jones MH, Frank DN, Guthrie C.** Characterization and functional ordering of Slu7p and Prp17p during the second step of pre-mRNA splicing in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*. **92** (21):9687-91, 1995.
- Juneau K, Palm C, Miranda M, Davis RW.** High-density yeast-tiling array reveals previously undiscovered introns and extensive regulation of meiotic splicing. *Proc Natl Acad Sci USA*. **104** (5):1522-7, 2007.
- Jurica MS, Moore MJ.** Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Mol. Cell* **12**: 5–14, 2003.
- Kaplan Y, Kupiec M.** A role for the yeast cell cycle/splicing factor Cdc40 in the G1/S transition. *Curr Genet*. **51** (2):123-40, 2007.
- Kim SH, Lin RJ.** Spliceosome activation by PRP2 ATPase prior to the first transesterification reaction of pre-mRNA splicing. *Mol Cell Biol*. **16** (12):6810-9, 1996.
- Kim, DH, Rossi JJ.** The first ATPase domain of the yeast 246-kDa protein is required for in vivo unwinding of the U4/U6 duplex. *RNA* **5**: 959–971, 1999.
- Kim YJ, Noguchi S, Hayashi YK, Tsukahara T, Shimizu T, Arahata K.** The product of an oculopharyngeal muscular dystrophy gene, poly(A)-binding protein 2, interacts with SKIP and stimulates muscle-specific gene expression. *Hum. Mol. Genet*. **10**: 1129–39, 2001.
- Kistler AL, Guthrie C.** Deletion of MUD2, the yeast homolog of U2AF65, can bypass the requirement for sub2, an essential spliceosomal ATPase. *Genes Dev*. **15**:42–49, 2001.
- Kornblihtt AR, de la Mata M, Fededa JP, Munoz MJ, Nogues G.** Multiple links between transcription and splicing. *RNA*. **10** (10):1489-98, 2004, Review.
- Koshland D, Kent JC, Hartwell LH.** Genetic analysis of the mitotic transmission of minichromosomes. *Cell* **40**:393–403, 1985.
- Kostrouchova M, Housa D, Kostrouch Z, Saudek V, Rall JE.** SKIP is an indispensable factor for *Caenorhabditis elegans* development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99** (14):9254-9, 2002.
- Kotovic KM, Lockshon D, Boric L, Neugebauer KM.** Cotranscriptional recruitment of the U1 snRNP to intron-containing genes in yeast. *Mol. Cell. Biol*. **23**: 5768–79, 2003.
- Koren A, Ben-Aroya S, Steinlauf R, Kupiec M.** Pitfalls of the synthetic lethality screen in *Saccharomyces cerevisiae*: an improved design. *Curr Genet*. **43**(1):62-9, 2003.
- Kuhn AN, Reichl EM, Brow DA.** Distinct domains of splicing factor Prp8 mediate different aspects of spliceosome activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 9145–9, 2002.
- Lacadie SA, Tardiff DF, Kadener S, Rosbash M.** In vivo commitment to yeast cotranscriptional splicing is sensitive to transcription elongation mutants. *Genes Dev*. **20**: 2055–66, 2006.
- Lamond AI, Spector DL.** Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **4** (8):605-12. Review, 2003.

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, et al., International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. **409** (6822):860-921, 2001.

Lesser CF, Guthrie C. Mutational analysis of pre-mRNA splicing in *Saccharomyces cerevisiae* using a sensitive new reporter gene, CUP1. *Genetics* **133**:851-863, 1993.

Leong GM, Subramaniam N, Figueroa J, Flanagan JL, Hayman MJ, Eisman JA, Kouzmenko AP. Ski-interacting protein interacts with Smad proteins to augment transforming growth factor-beta-dependent transcription. *J Biol Chem*. **276** (21):18243-8, 2001.

Liu L, Query CC, Konarska MM. Opposing classes of prp8 alleles modulate the transition between the catalytic steps of pre-mRNA splicing. *Nat. Struct. Mol. Biol*. **14**:519-526, 2007.

Lorenz MC, Muir RS, Lim E, McElver J, Weber SC, Heitman J. Gene disruption with PCR products in *S. cerevisiae*. *Gene*. **158** (1):113-7, 1995.

Lucchesi JC. Synthetic lethality and semi-lethality among functionally related mutants of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. **59** (1):37-44, 1968.

Madhani HD, Guthrie C. A novel base-pairing interaction between U2 and U6 snRNAs suggests a mechanism for the catalytic activation of the spliceosome. *Cell*. **71** (5):803-17, 1992.

Makarov EM, Makarova OV, Urlaub H, Gentzel M, Will CL, Wilm M, Luhrmann R. Small nuclear ribonucleoprotein remodeling during catalytic activation of the spliceosome. *Science*. **298** (5601):2205-8, 2002.

Martin A, Schneider S, Schwer B. Prp43 is an essential RNA dependent ATPase required for release of lariat-intron from the spliceosome. *J. Biol. Chem*. **277**: 17743–50, 2002.

Martínková K, Lebduška P, Skružný M, Folk P, Půta F. Functional mapping of *Saccharomyces cerevisiae* Prp45 identifies the SNW domain as essential for viability. *J Biochem (Tokyo)*. **132** (4):557-63, 2002.

Mayas RM, Maita H, Staley JP. Exon ligation is proofread by Prp22p, a DExD/H-box ATPase. *Nat. Struct. Mol. Biol*. **13**:482–490, 2006.

McDonald WH, Ohi R, Smelkova N, Frendewey D, Gould KL. Myb-related fission yeast cdc5p is a component of a 40S snRNP-containing complex and is essential for pre-mRNA splicing. *Mol Cell Biol*. **19**(8):5352-62, 1999.

McManus CJ, Schwartz ML, Butcher SE, Brow DA. A dynamic bulge in the U6 RNA internal stem-loop functions in spliceosome assembly and activation. *RNA*. **13**(12):2252-65, 2007.

McPheeters DS, Muhlenkamp P. Spatial organization of protein-RNA interactions in the branch site-3' splice site region during pre-mRNA splicing in yeast. *Mol Cell Biol*. **23** (12):4174-86, 2003.

McPheeters DS, Schwer B, Muhlenkamp P. Interaction of the yeast DExH-box RNA helicase prp22p with the 3' splice site during the second step of nuclear pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Res*. **28** (6):1313-21, 2000.

Mintz PJ, Patterson SD, Neuwald AF, Spahr CS, Spector DL. Purification and biochemical characterization of interchromatin granule clusters. *EMBO J*. **18**: 4308–20, 1999.

Moon A, Drubin DG. The ADF/cofilin proteins: stimulus-responsive modulators of actin dynamics. *Mol Biol Cell*. **6**(11):1423-31, 1995.

Mumberg D, Müller R, Funk M. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene*. **156** (1):119-22, 1995.

- Nagai K, Yamaguchi T, Takami T, Kawasumi A, Aizawa M, Masuda N, Shimizu M, Tominaga S, Ito T, Tsukamoto T, Osumi T.** SKIP modifies gene expression by affecting both transcription and splicing. *Biochem Biophys Res Commun.* **316** (2):512-7, 2004.
- Nasmyth KA, Tatchell K.** The structure of transposable yeast mating type loci. *Cell.* **19** (3):753-64, 1980.
- Neubauer G, King A, Rappsilber J, Calvio C, Watson M, Ajuh P et al.** Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex. *Nat. Genet.* **20**: 46–50, 1998.
- Newman AJ, Teigelkamp S, Beggs JD.** snRNA interactions at 5' and 3' splice sites monitored by photoactivated crosslinking in yeast spliceosomes. *RNA.* **1**(9):968-80, 1995.
- Newman AJ.** RNA Interactions in mRNA splicing. Encyclopedia of life sciences, 2008, overview.
- Nigavekar SS, Cannon JF.** Characterization of genes that are synthetically lethal with ade3 or leu2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **19** (2):115-22, 2002.
- Nilsen TW.** The spliceosome: The most complex macromolecular machine in the cell? *Bioessays* **25**: 1147–9, 2003.
- Ohi R, Feoktistova A, McCann S, Valentine V, Look AT, Lipsick JS, Gould KL.** Myb-related *Schizosaccharomyces pombe* cdc5p is structurally and functionally conserved in eukaryotes. *Mol Cell Biol.* **18** (7):4097-108, 1998.
- Ohi MD, Gould KL.** Characterization of interactions among the Cef1p-Prp19p-associated splicing complex. *RNA.* **8** (6):798-815, 2002.
- Ohi MD, Link AJ, Ren L, Jennings JL, McDonald WH, Gould KL.** Proteomics analysis reveals stable multiprotein complexes in both fission and budding yeasts containing Myb-related Cdc5p/Cef1p, novel pre-mRNA splicing factors, and snRNAs. *Mol Cell Biol.* **22** (7):2011-24, 2002.
- Ohi MD, Vander Kooi CW, Rosenberg JA, Chazin WJ, Gould KL.** Structural insights into the U-box, a domain associated with multi-ubiquitination. *Nat. Struct. Biol.* **10**: 250–255, 2003.
- Ohi MD, Vander Kooi CW, Rosenberg JA, Ren L, Hirsch JP, Chazin WJ, Walz T, Gould KL.** Structural and functional analysis of essential pre-mRNA splicing factor Prp19p. *Mol Cell Biol.* **25** (1):451-60, 2005.
- Ono S.** Regulation of actin filament dynamics by actin depolymerizing factor/cofilin and actin-interacting protein 1: new blades for twisted filaments. *Biochemistry.* **42** (46):13363-70, 2003.
- Ooi SL, Shoemaker DD, Boeke JD.** DNA helicase gene interaction network defined using synthetic lethality analyzed by microarray. *Nat Genet.* **35** (3):277-86, 2003.
- Ooi SL, Pan X, Peyser BD, Ye P, Meluh PB, Yuan DS, Irizarry RA, Bader JS, Spencer FA, Boeke JD.** Global synthetic-lethality analysis and yeast functional profiling. *Trends Genet.* **22** (1):56-63, 2006, Review.
- Peng J, Schwartz D, Elias JE, Thoreen CC, Cheng D, Marsischky G, Roelofs J, Finley D, Gygi SP.** A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat. Biotechnol.* **21**: 921–6, 2003.
- Perriman R, Barta I, Voeltz GK, Abelson J, Ares M Jr.** ATP requirement for Prp5p function is determined by Cus2p and the structure of U2 small nuclear RNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* **100** (24):13857-62, 2003.
- Pleiss JA, Whitworth GB, Bergkessel M, Guthrie C.** Transcript specificity in yeast pre-mRNA splicing revealed by mutations in core spliceosomal components. *PLoS Biol.* **5** (4):e90, 2007.

Prathapam T, Kuhne C, Banks L. The HPV-16 E7 oncoprotein binds Skip and suppresses its transcriptional activity. *Oncogene* **20** (52):7677-85, 2001.

Prathapam T, Kuhne C, Banks L. Skip interacts with the retinoblastoma tumor suppressor and inhibits its transcriptional repression activity. *Nucleic Acids Res.* **30**: 5261–8, 2002.

Proudfoot NJ, Furger A, Dye MJ. Integrating mRNA processing with transcription. *Cell.* 108(4):501-12. 2002, Review.

Pruyne D, Bretscher A. Polarization of cell growth in yeast. *J Cell Sci.***113** (Pt 4): 571-85, 2000, Review.

Query CC, Moore MJ, Sharp PA. Branch nucleophile selection in pre-mRNA splicing: evidence for the bulged duplex model. *Genes Dev.* **8**(5):587-97, 1994.

Raghubathan PL, Guthrie C. RNA unwinding in U4/U6 snRNPs requires ATP hydrolysis and the DEIH-box splicing factor Brr2. *Curr Biol.* **8** (15):847-55, 1998.

Rébora K, Desmoucelles C, Borne F, Pinson B, Daignan-Fornier B. Yeast AMP pathway genes respond to adenine through regulated synthesis of a metabolic intermediate. *Mol Cell Biol.* **21** (23):7901-12, 2001.

Rébora K, Laloo B, Daignan-Fornier B. Revisiting purine-histidine cross-pathway regulation in *S. cerevisiae*: a central role for a small molecule. *Genetics.* **170** (1):61-70, 2005.

Rein A. Retroviral RNA packaging: a review. *Arch Virol Suppl.* **9**:513-22, 1994, Review.

Reindle A, Belichenko I, Bylebyl GR, Chen XL, Gandhi N, Johnson ES. Multiple domains in Siz SUMO ligases contribute to substrate selectivity. *J Cell Sci.* **119** (22):4749-57, 2006.

Richards KL, Anders KR, Nogales E, Schwartz K, Downing KH, Botstein D. Structure-function relationships in yeast tubulins. *Mol Biol Cell.* **11**(5):1887-903, 2000.

Roy J, Kim K, Maddock JR, Anthony JG, Woolford Jr JL. The final stages of spliceosome maturation require Spp2p that can interact with the DEAH box protein Prp2p and promote step 1 of splicing. *RNA* **1**(4): 375–390, 1995.

Russell CS, Ben-Yehuda S, Dix I, Kupiec M, Beggs JD. Functional analyses of interacting factors involved in both pre-mRNA splicing and cell cycle progression in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA.* **6** (11):1565-72, 2000.

Rutz B, Seraphin B. Transient interaction of BBP/ScSF1 and Mud2 with the splicing machinery affects the kinetics of spliceosome assembly. *RNA* **5**:819–831, 1999.

Sanford JR, Ellis J, Cáceres JF. Multiple roles of arginine/serine-rich splicing factors in RNA processing. *Biochem Soc Trans.***33** (Pt 3):443-6, 2005, Review.

Saumweber H, Frasch M, Korge G. Two puff-specific proteins bind within the 2.5 kb upstream region of the *Drosophila melanogaster* Sgs-4 gene. *Chromosoma.* **99** (1):52-60, 1990.

Scott KL, Plon SE. CHES1/FOXN3 interacts with Ski-interacting protein and acts as a transcriptional repressor. *Gene.* **359**:119-26, 2005.

Schneider S, Schwer B. Functional domains of the yeast splicing factor Prp22p. *J Biol Chem.* **276** (24):21184-91, 2001.

Schneider S, Hotz HR, Schwer B. Characterization of dominant-negative mutants of the DEAH-box splicing factors Prp22 and Prp16. *J. Biol. Chem.* **277**:15452–8, 2002.

- Schneider S, Campodonico E, Schwer B.** Motifs IV and V in the DEAH box splicing factor Prp22 are important for RNA unwinding, and helicase-defective Prp22 mutants are suppressed by Prp8. *J Biol Chem.* **279** (10):8617-26, 2004.
- Schwer B, Guthrie C.** PRP16 is an RNA-dependent ATPase that interacts transiently with the spliceosome. *Nature.* **349** (6309):494-9, 1991.
- Schwer B, Guthrie C.** A dominant negative mutation in a spliceosomal ATPase affects ATP hydrolysis but not binding to the spliceosome. *Mol Cell Biol.* **12** (8):3540-7, 1992.
- Schwer B, Gross CH.** Prp22, a DExH-box RNA helicase, plays two distinct roles in yeast pre-mRNA splicing. *EMBO J.* **17** (7):2086-94, 1998.
- Schwer B, Meszaros T.** RNA helicase dynamics in pre-mRNA splicing. *EMBO J.* **19** (23):6582-9, 2000.
- Schwer B.** A conformational rearrangement in the spliceosome sets the stage for Prp22-dependent mRNA release. *Mol Cell.* **30** (6):743-54, 2008.
- Sikorski RS, Hieter P.** A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **122** (1):19-27, 1989.
- Silverman E, Edwalds-Gilbert G, Lin RJ.** DEXD/H-box proteins and their partners: helping RNA helicases unwind. *Gene* **312**: 1–16, 2003.
- Silverman EJ, Maeda A, Wei J, Smith P, Beggs JD, Lin RJ.** Interaction between a G-patch protein and a spliceosome DEXD/H-box ATPase that is critical for splicing. *Mol. Cell. Biol.* **24**: 10101–10, 2004.
- Small EC, Leggett SR, Winans AA, Staley JP.** The EF-G-like GTPase Snu114p regulates spliceosome dynamics mediated by Brr2p, a DEXD/H box ATPase. *Mol Cell.* **23** (3):389-99, 2006.
- Spingola M, Grate L, Haussler D, Ares M Jr.** Genome-wide bioinformatic and molecular analysis of introns in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA.* **5** (2):221-34, 1999.
- Staley JP, Guthrie C.** Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell.* **92** (3):315-26, 1998.
- Staley JP, Guthrie C.** An RNA switch at the 5' splice site requires ATP and the DEAD box protein Prp28p. *Mol Cell.* **3** (1):55-64, 1999.
- Stevens SW, Ryan DE, Ge HY, Moore RE, Young MK, Lee TD, Abelson J.** Composition and functional characterization of the yeast spliceosomal penta-snRNP. *Mol. Cell.* **9** (1): 31-44, 2002.
- Tanaka N, Schwer B.** Characterization of the NTPase, RNA-binding, and RNA helicase activities of the DEAH-box splicing factor Prp22. *Biochemistry* **44**: 9795-9803, 2005.
- Tanaka N, Aronová A, Schwer B.** Ntr1 activates the Prp43 helicase to trigger release of lariat-intron from the spliceosome. *Genes Dev.* **21**:2312-2325, 2007.
- Tang J, Chang HY, Yang X.** The death domain-associated protein modulates activity of the transcription co-factor Skip/NcoA62. *FEBS Lett.* **579** (13):2883-90, 2005.
- Tardiff DF, Lacadie SA, Rosbash M.** A genome-wide analysis indicates that yeast pre-mRNA splicing is predominantly posttranscriptional. *Mol Cell.* **24** (6):917-29, 2006.
- Tarn WY, Hsu CH, Huang KT, Chen HR, Kao HY, Lee KR, Cheng SC.** Functional association of essential splicing factor(s) with PRP19 in a protein complex. *EMBO J.* **13** (10):2421-31, 1994.

Teigelkamp S, Newman AJ, Beggs JD. Extensive interactions of PRP8 protein with the 5' and 3' splice sites during splicing suggest a role in stabilization of exon alignment by U5 snRNA. *EMBO J.* **14** (11):2602-12, 1995a.

Teigelkamp S, Whittaker E, Beggs JD. Interaction of the yeast splicing factor PRP8 with substrate RNA during both steps of splicing. *Nucleic Acids Res.* **23**: 320–326, 1995b.

Tong AH, Evangelista M, Parsons AB, Xu H, Bader GD, Pagé N, Robinson M, Raghibizadeh S, Hogue CW, Bussey H, Andrews B, Tyers M, Boone C. Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science.* **294** (5550):2364-8, 2001.

Tsai WY, Chow YT, Chen HR, Huang KT, Hong RI, Jan SP, Kuo NY, Tsao TY, Chen CH, Cheng SC. Cef1p is a component of the Prp19p-associated complex and essential for pre-mRNA splicing. *J Biol Chem.* **274** (14):9455-62, 1999.

Tsai RT, Fu RH, Yeh FL, Tseng ChK, Lin YCh, Huang Y, Cheng Sch. Spliceosome disassembly catalyzed by Prp43 and its associated components Ntr1 and Ntr2. *Genes & Dev.* **19**: 2991-3003, 2005.

Tsai RT, Tseng CK, Lee PJ, Chen HC, Fu RH, Chang KJ, Yeh FL, Cheng SC. Dynamic interactions of Ntr1-Ntr2 with Prp43 and with U5 govern the recruitment of Prp43 to mediate spliceosome disassembly. *Mol Cell Biol.* **27** (23):8027-37, 2007.

Tucker ChL, Fields S. Lethal combinations. *Nature genetics.* **35** (3):204-5, 2003.

Umen JG, Guthrie C. Prp16p, Slu7p, and Prp8p interact with the 3' splice site in two distinct stages during the second catalytic step of pre-mRNA splicing. *RNA.* **1**(6):584-97, 1995a.

Umen JG, Guthrie C. The second catalytic step of pre-mRNA splicing. *RNA.* **1** (6):869-885, 1995b.

van Nues RW, Beggs JD. Functional contacts with a range of splicing proteins suggest a central role for Brr2p in the dynamic control of the order of events in spliceosomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **157** (4):1451-67, 2001.

Vijayraghavan U, Company M, Abelson J. Isolation and characterization of pre-mRNA splicing mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **3** (8):1206-16, 1989.

Vincent K, Wang Q, Jay S, Hobbs K, Rymond BC. Genetic interactions with CLF1 identify additional pre-mRNA splicing factors and a link between activators of yeast vesicular transport and splicing. *Genetics.* **164**(3):895-907, 2003

Wach A, Brachat A, Pöhlmann R, Philippsen P. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast.* **10** (13):1793-808, 1994.

Wagner JD, Jankowsky E, Company M, Pyle AM, Abelson JN. The DEAH-box protein PRP22 is an ATPase that mediates ATPdependent mRNA release from the spliceosome and unwinds RNA duplexes. *EMBO J.* **17**: 2926–37, 1998.

Wang Q, Hobbs K, Lynn B, Rymond BC. The Clf1p splicing factor promotes spliceosome assembly through N-terminal tetratricopeptide repeat contacts. *J Biol Chem.* **278** (10):7875-83, 2003.

Wang Q, Zhang L, Lynn B, Rymond BC. A BBP-Mud2p heterodimer mediates branchpoint recognition and influences splicing substrate abundance in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* **36** (8):2787-98, 2008.

Wieland C, Mann S, von Besser H, Saumweber H. The *Drosophila* nuclear protein Bx42, which is found in many puffs on polytene chromosomes, is highly charged. *Chromosoma.* **101** (8):517-25, 1992.

Winsor B, Schiebel E. Review: an overview of the *Saccharomyces cerevisiae* microtubule and microfilament cytoskeleton. *Yeast.* **13** (5):399-434, 1997.

- Wolven AK, Belmont LD, Mahoney NM, Almo SC, Drubin DG.** In vivo importance of actin nucleotide exchange catalyzed by profilin. *J Cell Biol.* **150** (4):895-904, 2000.
- Wu S, Romfo CM, Nilsen TW, Green MR.** Functional recognition of the 30 splice site AG by the splicing factor U2AF35. *Nature.* **402**:832–835, 1999.
- Xu YZ, Query CC.** Competition between the ATPase Prp5 and branch region-U2 snRNA pairing modulates the fidelity of spliceosome assembly. *Mol Cell.* **28** (5):838-49, 2007.
- Yeh J, Haarer BK.** Profilin is required for the normal timing of actin polymerization in response to thermal stress. *FEBS Lett.* **398**(2-3):303-7, 1996.
- Zhang K, Smouse D, Perrimon N.** The crooked neck gene of Drosophila contains a motif found in a family of yeast cell cycle genes. *Genes & Dev.* **5**:1080–91, 1991.
- Zhang X, Schwer B.** Functional and physical interaction between the yeast splicing factors Slu7 and Prp18. *Nucleic Acids Res.* **25** (11):2146-52, 1997.
- Zhang M, Green MR.** Identification and characterization of yUAP/Sub2p, a yeast homolog of the essential human pre-mRNA splicing factor hUAP56. *Genes Dev.* **15**:30–35, 2001.
- Zhang C, Dowd DR, Staal A, Gu C, Lian JB, van Wijnen AJ, Stein GS, MacDonald PN.** Nuclear coactivator-62 kDa/Ski-interacting protein is a nuclear matrix-associated coactivator that may couple vitamin D receptor-mediated transcription and RNA splicing. *J Biol Chem.* **278** (37):35325-36, 2003.
- Zhou S, Fujimuro M, Hsieh JJ, Chen L, Miyamoto A, Weinmaster G, Hayward SD.** SKIP, a CBF1-associated protein, interacts with the ankyrin repeat domain of NotchIC To facilitate NotchIC function. *Mol Cell Biol.* 2400-10, 2000.
- Zhu W, Rainville IR, Ding M, Bolus M, Heintz NH, Pederson DS.** Evidence that the pre-mRNA splicing factor Clf1p plays a role in DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **160** (4):1319-33, 2002.

9. Příloha

	<i>gen^R</i>	37°C	38°C	39°C	<i>TRP1</i>	<i>ADE3</i>	a/alfa		<i>gen^R</i>	37°C	38°C	39°C	<i>TRP1</i>	<i>ADE3</i>	a/alfa
1A	+	-	-	-	-	+	α	13B	+	+/-	-	-	+	-	α
1D	-	+	+	+	+	+		13C	+	-	-	-	-	+	a
2A	-	+	+	+	+	-		13D	-	+	+	+	-	-	
5A	-	+	+	+	+	-		14A	+	+/-	-	-	+	+	
5D	-	+	+	+	+	+		14C	-	+	+	+	+	+	
6A	-	+	+	+	+	+		15A	-	+	+	+	-	-	
7A	-	+	+	+	+	-		16A	+	-	-	-	-	+	a
7B	-	+	+	+	+	-		16B	-	+	+	+	-	-	
8A	-	+	+	+	-	+		16C	-	+	+	+	+	-	
8B	-	+	+	+	+	-		16D	-	+	+	+	+	-	
8C	+	+/-	-	-	+	-	α	17A	+	-	-	-	+	-	a
9B	-	+	+	+	-	-		17B	-	+	+	+	-	+	
9D	+	-	-	-	+	-	α	17C	+	-	-	-	+	-	α
10A	-	+	+	+	+	+		17D	-	+	+	+	-	+	
10B	-	+	+	+	-	-		18A	+	+/-	-	-	+	+	
10C	+	-	-	-	+	-	α	18B	-	+	-	-	-	+	α
10D	+	+/-	-	-	-	+	α	18C	-	+	+	+	-	-	
11A	+	-	-	-	+	+		18D	+	-	-	-	+	-	a
11B	-	+	+	+	-	-		19A	+	+/-	-	-	+	+	
12B	-	+	+	+	-	+		19C	-	+	+	+	-	-	
12C	+	-	-	-	+	-	α	20A	-	+	+	+	+	-	
13A	-	+	+	+	+	+		20B	-	+	+	+	-	-	

Tab. 8.1. Přehled jednotlivých genotypů u získaných haploidních buněk po sporulaci a následné tetradové analýze rodičovských kmenů FPY4B a w303-1a.

Po sporulaci a následné mikromanipulaci 20 tetrad bylo získáno 44 životaschopných haploidních buněk.

	<i>gen^R</i>	5-FOA	37°C	39°C	<i>TRP1</i>	<i>ADE3</i>	a/alfa		<i>gen^R</i>	5-FOA	37°C	39°C	<i>TRP1</i>	<i>ADE3</i>	a/alfa
1A	+	+	-	-	+	-		10B	-	+	+	+	-	+	
1B	-	+	+	+	+	+		10C	+	+	+/-	-	+	+	
1C	-	+	+	+	-	-		10D	+	+	-	-	-	-	a
1D	+	+	-	-	-	+		11A	+	+	+/-	-	-	-	a
2A	-	+	+	+	+	+		11B	-	+	+	+	+	+	
2D	+	+	-	-	+	-		11C	+	+	-	-	+	-	
3B	-	+	+	+	+	+		11D	-	+	+	+	-	+	
3C	-	+	+	+	-	-		12A	-	+	+/-	-	-	-	
4A	+	+	+/-	-	-	-	a	12B	-	+	+	+	+	+	
5A	-	+	+	+	-	-		12C	+	+	-	-	-	+	
5B	+	+	-	-	+	+		12D	+	+	-	-	+	-	
5C	+	+	-	-	-	+		13A	-	+	+	+	+	+	
5D	-	+	+	+	+	-		13B	-	+	+	-	-	-	
6A	-	+	+	+	+	+		13C	+	+	-	-	-	+	
6B	+	+	+/-	-	-	+		13D	+	+	-	-	+	-	
6C	+	+	-	-	+	-		14A	+	+	-	-	-	-	a
6D	-	+	+	-	-	-		15A	-	+	+	+	-	+	
7A	-	+	+	+	+	+		15C	+	+	-	-	+	-	
7B	+	+	+/-	-	-	-	α	15D	-	+	+/-	-	+	+	
7C	-	+	-	-	+	-		16A	+	+	+/-	-	-	-	a
7D	+	+	-	-	-	+		16B	-	+	+/-	-	+	-	
8A	-	+	+	+	-	+		16D	+	+	-	-	+	+	
8B	+	+	+/-	-	+	-		17A	+	+	-	-	+	-	
9A	-	+	+	+	-	+		17B	+	+	+/-	-	-	+	
9B	+	+	+/-	-	-	+		17C	-	+	+	+	-	+	
9C	-	+	+	+	+	-		17D	-	+	+	+	+	-	
9D	+	+	-	-	+	-		18B	+	+	+/-	-	-	-	α
10A	-	+	+	+	+	-		18D	+	+	+/-	-	+	+	

Tab. 8.2. Přehled jednotlivých genotypů u získaných haploidních buněk po sporulaci a následné tetrádové analýze rodičovských kmenů FPY4B a w303-1a transformovaných plazmidem p416ADH-PRP45.

Diploid byl před sporulací transformován plazmidem p416ADH-PRP45 (ADH promotor, *CYC1* terminátor, *URA3*, *PRP45*, *amp^R*, *cen*). Celkem bylo manipulováno 18 věcek a získáno 56 haploidních potomků. Vyžadují-li buňky s požadovaným genotypem divokou alelu genu *PRP45* ke svému přežití, pak nejsou schopné růst na médiu s 5-FOA. Následný test růstu získaných klonů na médiu s 5-FOA nepotvrdil žádný vztah mezi hledaným genotypem a přítomností zkrácené varianty *prp45(1-169)*.

	<i>gen^R</i>	37°C	39°C	<i>ADE3</i>	a/alfa		<i>gen^R</i>	37°C	39°C	<i>ADE3</i>	a/alfa
2A	+	+/-	-	-	a	7D	+	-	-	+	
2B	-	+	+	-		8A	-	+	+	-	
2C	+	-	-	-	α	8B	-	+	+	+	
2D	-	+	+	-		8C	+	-	-	-	a
3A	-	+	+	-		8D	+	+/-	-	-	α
3B	+	-	-	+		9A	+	-	-	+	
3C	-	+	+	-		9B	-	+	+	-	
3D	+	-	-	-	α	9C	+	+/-	-	-	α
4A	-	+	+	-		9D	-	+	+	-	
4B	+	-	-	+		10A	-	+	+	-	
4C	-	+	+	-		10B	+	-	-	-	α
4D	+	+/-	-	-	α	10C	+	+/-	-	-	α
5A	-	+/-	-	+		10D	-	+	+	-	
5B	+	-	-	+		11A	-	+	+	+	
5C	+	+/-	-	-	α	11B	+	+/-	-	-	a
5D	-	+	+	-		11C	+	-	-	-	α
7A	-	+	+	-		11D	-	+	+	-	
7B	+	+/-	-	-	a	12C	-	+	+	+	
7C	-	+	-	-		12D	-	+	+	-	

Tab. 8.3. Přehled jednotlivých genotypů u získaných haploidních buněk po sporulaci a následné tetradové analýze rodičovských kmenů AVY02 a JB.

Šedě jsou zvýrazněny klony, které splňují požadavky pro nový kmen.

Znaménko + označuje:

- *gen^R*- rezistenci k selekčnímu antibiotiku geneticinu (G418), médium YPAD
- **37, 38 a 39°C** - necitlivost buněk na růst v restriktivní teplotě, médium YPAD
- *ADE3*- kolonie jsou červeného zabarvení, funkční *ADE3* gen, médium YPD
- *TRP1*- prototrofie k aminokyselině tryptofan, funkční *TRP1* gen, minimální SD médium bez tryptofanu

Kontrolní kmeny pro určení párovacího typu:

- **PLAS1-6A:** MATalfa *ura3-52 his4d29*
- **PLAS1-7D:** MATa *ura3-52 his4d29*

= selekce diploidů byla provedena na minimálním SD médiu bez histidinu (rodiče, FPY4B a w303-1a, AVY02 a JB, mají genotyp *his3*)

poznámka: Částečná sensitivita potomků křížení kmenů FPY4B a w303-1a a křížení AVY02 a JB k teplotě 37°C je způsobena pravděpodobně rozdílným genetickým pozadím rodičů, které se projevuje odlišnou mírou citlivosti ke zvýšené kultivační teplotě.

